

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE TOXICOLOGÍA Y FARMACOLOGÍA



TESIS DOCTORAL

**El receptor $\alpha 2$ adrenérgico de la célula cromafín de la
médula adrenal: ¿una nueva diana para el tratamiento del
dolor neuropático?**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

Marina Arribas Blázquez

DIRECTORES

Antonio Rodríguez Artalejo
Luis Alcides Olivos-Oré

Madrid, 2018



Universidad Complutense de Madrid

FACULTAD DE VETERINARIA

Departamento de Toxicología y Farmacología

El receptor α_2 adrenérgico de la célula cromafín de la médula adrenal: ¿Una nueva diana para el tratamiento del dolor neuropático?



TESIS DOCTORAL
Marina Arribas Blázquez

Madrid, 2017

Dr. Luis Alcides Olivos-Oré
Dr. Antonio Rodríguez Artalejo

Universidad Complutense de Madrid

Facultad de Veterinaria

Departamento de Toxicología y Farmacología



El receptor $\alpha 2$ adrenérgico de la célula cromafín de la médula adrenal: ¿Una nueva diana para el tratamiento del dolor neuropático?

Memoria de tesis para optar al Grado de Doctor

Marina Arribas Blázquez

DIRECTORES

Dr. Antonio R. Artalejo

Dr. Luis Alcides Olivos-Oré



UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
Facultad de Veterinaria
Departamento de Toxicología y Farmacología

Antonio Rodríguez Artalejo y Luis Alcides Olivos Oré, Catedrático y Profesor Contratado Doctor (I), respectivamente, de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid,

CERTIFICAN:

Que Dña. Marina Arribas Blázquez, ha realizado bajo su dirección, en el Departamento de Toxicología y Farmacología de la Facultad de Veterinaria, el trabajo de investigación titulado " El receptor $\alpha 2$ adrenérgico de la célula cromafín de la médula adrenal: ¿Una nueva diana para el tratamiento del dolor neuropático?" como trabajo de Tesis para optar al Grado de Doctor por la Universidad Complutense de Madrid.

Madrid, 30 de marzo de 2017

Fdo.: Antonio Rodríguez Artalejo

Fdo.: Luis A. Olivos-Oré

Me gustaría dedicar esta tesis a mi familia, especialmente a mis padres y abuelos, por su cariño y dedicación, ya que sin su apoyo no hubiera podido llegar hasta aquí.

A Rodrigo y Alejandro.

Agradecimientos

“Si quieres ir rápido camina solo; pero si quieres llegar lejos, camina acompañado”...y en este camino son muchas las personas que han estado a mi lado y a las que me gustaría agradecer su ayuda, tanto en mi crecimiento personal como profesional.

En primer lugar, a Antonio R. Artalejo, que confió en mí para iniciarme profesionalmente en el mundo de la investigación. Por ser un referente con su actividad investigadora que además de causarme admiración y respeto por su dedicación y pasión por la ciencia, siempre me ha hecho sentir muy arropada a lo largo de estos años. Gracias por la oportunidad que me brindo y que me ha hecho sentir la Facultad de Veterinaria como “mi casa”.

A Luis, por transmitirme incansablemente sus conocimientos científicos y, especialmente, por sus enseñanzas de electrofisiología que tantas alegrías y “dolores/estreses” nos ha dado. Pero también por enriquecerme tanto en la parte personal, por su apoyo, sus consejos y sus críticas constructivas que he aprendido a escuchar, asimilar y me han hecho madurar e ir mejorando; espero que esta tesis sea una parte de mi agradecimiento.

A Mariví, por su gran ayuda en la evaluación comportamental de los animales. Muchísimas gracias por tener siempre la puerta abierta de tu despacho para mí, por acogerme y cuidarme tanto. Junto a Mariló, Sebas Manolo y Casilda formáis parte de lo que considero mi familia de Madrid. No creo que pueda mostraros en unas líneas todo el cariño que os tengo; sabed, al menos, que en Ávila tenéis siempre vuestra casa.

A todas las personas que componen la Unidad de Farmacología: Fernando, Julio, Chema, Juan Antonio, Teresa, Diego y Jesús por vuestras enseñanzas y amistad.

A José (mi paisano) y a Mariano, que han cuidado de nuestros animales para que siempre tuviéramos las mejores células; y porque siempre han estado disponibles en aquellos momentos que los he necesitado.

A mis “compañeros de comedor”: Ana, José, Sebas, Luis y Mariví que con sus charlas ayudaban a evadirme de los malos momentos en el laboratorio y me animaban a seguir trabajando y, especialmente, a Teresa por cuidar tanto mi “alimentación” y conseguir que mi madre se sintiera tranquila estando en tus manos.

A Esperanza, por los buenos momentos que pasamos los meses que coincidimos en el laboratorio, por permitirme compartir su sensibilidad por el dibujo y la ciencia, y por ayudarme en la parte inmunohistoquímica de este trabajo.

A Ana Ruiz, Aneta Wojnicz y Ricardo Pascual, por su siempre buena disposición en este trabajo, en concreto la determinación de catecolaminas plasmáticas y adrenoglandulares.

A Mercedes Sánchez de la Muela, por su tiempo, amabilidad y destreza quirúrgica con los animales empleados en este estudio.

A M^a Teresa Miras-Portugal y toda la gente del Departamento de Bioquímica y Biología Molecular, por toda su ayuda durante estos años. Porque la cercanía física y anímica hace muy fácil la colaboración científica.

A Paco y Cecilio, por enseñarme nuevas técnicas de laboratorio y acogerme en su laboratorio; por estar dispuestos a guiarme y ayudarme siempre que lo he necesitado.

A mis amigos de los laboratorios 306 y 304 del CBM. En especial a Lola, Nacho y David, porque hicisteis ese año que pasamos juntos muy fácil para mí. Gracias por vuestro cariño, por las salidas de los viernes y por siempre estar dispuestos a organizar todo tipo de actividades que espero volver a compartir pronto.

A mis amigos de Veterinaria: José, Aida, Felipe, Rosa, Ricardo, Alberto, y en especial a Bea con la que además de compartir vecindad de laboratorio he podido conocer fuera y hacer una bonita amistad, y a Andrea, por ser mi “ojito derecho” de Veterinaria, por tu sinceridad, tus consejos y tu cariño siempre.

A mis amigos de Madrid, Ávila, Perú y Guatemala por acompañarme estos años. A Rubén, Alberto (Carolo), Javi (Brisacas), Lisa, Pamela, Ana, Ana, Laura, Blanca, Laura, Patricia, Tania. Por los viajes a lo largo del mundo, los festivales de música, todas las actividades de playa, montaña, carreras solidarias ... Por enriquecer tanto mi vida y saber que puedo contar no solo en los buenos momentos, con cada uno de vosotros. A toda la gente que a lo largo de estos años ha pasado por mi vida, porque todos me enseñaron algo.

A Daniel, Mijares, por demostrarme lo que es verdaderamente la amistad, acompañarme en los momentos malos haciéndome crecer y superar los problemas. Aprender a valorar junto a él las pequeñas cosas y disfrutar de tantos momentos inolvidables. Gracias.

A Andrés, por aguantar mis subidas y bajadas de carácter estos últimos meses con paciencia, demostrarme siempre su cariño y apoyo. Tampoco puedo describir todo lo que te quiero aquí, espero seguir creciendo a tu lado.

A mi familia, porque puedo presumir de tener a cada uno de vosotros para mí; A mis tíos, Javi, Isabel, Pili, Miguel, Nuria, Sonsoles, Cheli y Luis y mis primos Javi y Cristina. En especial a Ana y a Oscar que más que tíos considero mis hermanos mayores, y a Rodrigo y Alejandro espero que os podáis sentir orgullosos de mí y guardar con cariño esta tesis que aunque entendáis muy poco o nada es el fruto de un gran esfuerzo que además de hacerme crecer profesionalmente quisiera que sirva para agradecerlos todo lo que hacéis por mí.

A mis abuelos, los tesoros más preciados. A mi abuelo Víctor y a Chela. A Mami y Tito. Por ser mis referentes por vuestros valores, por vuestro amor y la labor de “segundos padres” que habéis realizado a lo largo de estos años. Puedo presumir de tenerlos llenos de vitalidad a pesar de algún “dolorcillo”, interesándoos por estar al tanto de las nuevas tecnologías para poder chatear y mandar fotos tratando de estar siempre en contacto conmigo a pesar de la distancia.

A mis padres, Víctor y Rosa por su dedicación absoluta a mí, por darme la tranquilidad de saber que os voy a tener siempre que lo necesite; no os cambiaría por nada del mundo. Porque espero que podáis sentirlos orgullosos de mí. Os quiero de corazón y sois mi debilidad.

Este trabajo ha sido realizado en el marco de los Proyectos de Investigación, BFU2011-26253 y CSD2008-00005 del Gobierno de España y S2013/ICE-2958 BRADE de la Comunidad Autónoma de Madrid.

ÍNDICE

ÍNDICE	9
ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS	15
ABREVIATURAS	23
RESUMEN	29
ABSTRACT	33
I. INTRODUCCIÓN	37
1.1. El dolor	37
1.1.1. Clasificación	37
1.1.2. Neurobiología del dolor	38
1.1.3. Transducción	39
1.1.3.1. Canales TRP	41
1.1.3.2. Mecanociceptores	43
1.1.3.3. Quimioceptores	44
1.1.3.3.1. Receptores de bradicinina	44
1.1.3.3.2. Canales CISA	44
1.1.3.3.3. Receptores de histamina y 5-HT	45
1.1.3.3.4. Receptores de glutamato	45
1.1.3.3.5. Receptores de ATP	47
1.1.4. Transmisión	49
1.1.5. Modulación	53
1.1.6. Percepción	55
1.1.7. Fisiopatología del dolor crónico	56
1.1.8. Modelos animales para el estudio del dolor neuropático	63
1.1.9. Tratamiento del dolor	66
1.1.9.1. AINE	67
1.1.9.2. Opioides	68
1.1.9.3. Antidepresivos	70
1.1.9.4. Anticonvulsivantes	70
1.1.9.5. Ketamina	70
1.1.9.6. Agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos	71
1.1.9.7. Otros fármacos analgésicos y coadyuvantes	71
1.1.9.8. Otras terapias tópicas y locales	72
1.1.9.8.1. Capsaicina	72
1.1.9.8.2. Anestésicos locales	72
1.1.9.8.3. Toxinas	72
1.2. El estrés	73
1.2.1. El sistema nervioso simpático y el dolor	75
1.2.1.1. Respuesta del sistema nervioso simpático durante el dolor	76
1.2.1.1.1. Participación del sistema nervioso simpático en la generación del dolor	77
1.2.1.1.2. Contribución del sistema nervioso simpático en la generación de dolor secundario a la lesión de un nervio periférico	78
- Modificaciones en la inervación simpática	78
- Cambios en la expresión de adrenoceptores	80
- Modificaciones en la actividad de la glándula adrenal	81
1.3. La glándula adrenal	82
1.3.1. Morfología de la glándula adrenal	83
1.3.1.1. La corteza adrenal	83
1.3.1.2. La médula adrenal	86
1.3.2. Biosíntesis de las catecolaminas	88
1.3.3. Propiedades eléctricas de las células cromafines	90

1.3.3.1. <i>Propiedades pasivas de la membrana</i>	90
1.3.3.2. <i>El potencial de membrana en reposo</i>	90
1.3.3.3. <i>Generación del potencial de acción</i>	91
1.3.3.4. <i>Canales iónicos de las células cromafines</i>	91
1.3.3.4.1. <i>Canales de Na⁺</i>	91
1.3.3.4.2. <i>Canales de Ca²⁺</i>	92
1.3.3.4.3. <i>Canales de K⁺</i>	93
a) <i>Dependientes de voltaje</i>	93
b) <i>Dependientes de calcio</i>	94
1.3.3.5. <i>Los nAChRs de las células cromafines</i>	94
1.3.3.6. <i>Acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines</i>	97
1.4. <i>Los receptores adrenérgicos</i>	98
1.4.1. <i>Los receptores adrenérgicos en el dolor y la analgesia</i>	102
II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS	107
III. MATERIALES Y MÉTODOS	111
3.1. <i>Animales de experimentación</i>	111
3.2. <i>Materiales y equipos</i>	111
3.2.1. <i>Fármacos y productos químicos</i>	111
3.2.2. <i>Materiales, equipos y software</i>	113
3.3. <i>Modelos experimentales</i>	114
3.3.1. <i>Modelo de dolor neuropático:</i>	114
<i>Constricción crónica del nervio ciático</i>	
3.3.2. <i>Modelo de estrés crónico por frío</i>	115
3.4. <i>Experimentos “in vivo”</i>	115
3.4.1. <i>Evaluación fisiológica</i>	115
3.4.2. <i>Evaluación conductual</i>	115
3.4.2.1. <i>Alodinia mecánica</i>	116
3.4.2.2. <i>Alodinia al frío</i>	117
3.4.2.3. <i>Hiperalgia mecánica</i>	118
3.4.2.4. <i>Ensayo de coordinación motora</i>	119
3.4.2.5. <i>Administración de fármacos en los estudios comportamentales</i>	119
3.4.3. <i>Medida de la presión arterial y la frecuencia cardíaca</i>	120
3.4.4. <i>Extracción de muestras de suero para la cuantificación de catecolaminas</i>	121
3.4.5. <i>Determinación de CAs por HPLC-MS</i>	121
3.5. <i>Experimentos “in vitro”</i>	122
3.5.1. <i>Cuantificación de las catecolaminas adrenoglandulares y plasmáticas</i>	122
3.5.2. <i>Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de rata</i>	123
3.5.3. <i>Cultivo primario de neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata</i>	124
3.5.4. <i>Inmunohistoquímica</i>	125
3.5.5. <i>Preparación de cortes de glándula adrenal</i>	126
3.5.6. <i>Registros electrofisiológicos</i>	126
3.5.6.1. <i>Registro de corrientes iónicas en células cromafines aisladas y neuronas DRG de la rata</i>	128
3.5.6.2. <i>Registro de corrientes iónicas en cortes de la glándula adrenal de la rata</i>	130
3.5.7. <i>Administración de fármacos</i>	130

<i>en experimentos electrofisiológicos</i>	
3.6. Análisis de datos y pruebas de significación estadística	131
IV. RESULTADOS	135
4.1. Implementación de la CCI del nervio ciático de la rata como modelo de dolor neuropático	135
4.1.1. <i>Modificaciones en el comportamiento nocifensivo: alodinia mecánica y al frío, e hiperalgesia mecánica</i>	135
4.1.2. <i>Modificaciones en la estructura de los ganglios espinales (DRG) y en la expresión de receptores purinérgicos P2X3</i>	138
4.2. La CCI del nervio ciático de la rata como modelo de estrés	139
4.2.1. <i>Efectos sobre el estado metabólico y el tamaño de las glándulas adrenales de los animales</i>	139
4.2.2. <i>Efecto sobre el contenido adrenoglandular y los niveles circulantes de CAs</i>	141
4.2.3. <i>Efecto sobre el patrón de inervación de las células cromafines y la transmisión en la sinapsis esplacno-cromafín</i>	143
4.2.4. <i>Efectos sobre los nAChR, las conductancias iónicas dependientes de voltaje y la respuesta exocitótica de las células cromafines de la médula adrenal.</i>	145
4.3. La contribución de las células cromafines de la médula adrenal en la fisiopatología del dolor inducido por la CCI del nervio ciático	148
4.3.1. <i>Efecto del SKF29661 sobre la respuesta nocifensiva y la función de la médula adrenal</i>	148
4.3.1.1. <i>Efecto de SKF29661 sobre la alodinia mecánica y al frío</i>	148
4.3.1.2. <i>Efecto de SKF29661 sobre el contenido adrenoglandular y los niveles circulantes de CAs</i>	151
4.3.1.3. <i>Efecto de SKF29661 sobre la función de las células cromafines</i>	153
4.4. Los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos periféricos como dianas de fármacos analgésicos en la CCI del nervio ciático de la rata	155
4.4.1. <i>Efectos de la Dexmedetomidina</i>	155
4.4.1.1. <i>Efecto sobre la alodinia mecánica y al frío</i>	155
4.4.1.2. <i>Efecto sobre la función de las células cromafines</i>	158
4.4.2. <i>Efectos del MPV2426</i>	166
4.4.2.1. <i>Efecto sobre la alodinia mecánica y la coordinación motora</i>	166
4.4.2.2. <i>Efecto sobre el contenido adrenoglandular</i>	168
4.4.2.3. <i>Efecto sobre la función de las células cromafines</i>	169
4.4.2.4. <i>Efectos sobre la función de las neuronas DRG</i>	171
4.5. La contribución del sistema nervioso simpático a la fisiopatología del dolor inducido por la CCI del nervio ciático	174
4.5.1. <i>Efectos de la guanetidina sobre la alodinia mecánica y al frío</i>	174
4.5.2. <i>Efectos de la guanetidina sobre el contenido adrenoglandular y los niveles circulantes de CAs</i>	174

4.6. Modulación catecolaminérgica de la nocicepción	176
4.6.1. Efecto de la administración local de A sobre la sensibilidad mecánica en animales sanos	176
4.6.2. Contribución de las CAs endógenas a la alodinia mecánica	177
V. DISCUSIÓN	181
5.1. Implementación del modelo de dolor neuropático	182
5.2. La CCI del nervio ciático como modelo de estrés: participación del sistema simpatoadrenal	185
5.3. Influencia del sistema simpatoadrenal sobre la fenomenología del dolor neuropático	186
5.4. Los receptores α_2 adrenérgicos periféricos como dianas de fármacos analgésicos en el dolor neuropático	188
5.5. Consideraciones finales y perspectivas	189
VI. CONCLUSIONES	197
VII. BIBLIOGRAFÍA	201

ÍNDICE DE FIGURAS Y TABLAS

FIGURAS

Figura 1.1. Clasificación del dolor	37
Figura 1.2. Fases del dolor	39
Figura 1.3. La transducción del dolor	40
Figura 1.4. Canales TRP	42
Figura 1.5. Esquema del rango de temperaturas de activación de los canales TRP	43
Figura 1.6. La sinapsis glutamatérgica	47
Figura 1.7. Relación entre el tipo de fibra nerviosa y la velocidad de conducción	50
Figura 1.8. La transmisión dolorosa	51
Figura 1.9. Fibras C peptidérgicas	53
Figura 1.10. La modulación nociceptiva a través de las células ON/OFF	55
Figura 1.11. Sensibilización periférica	59
Figura 1.12. Sensibilización central	59
Figura 1.13. Curva intensidad del estímulo-respuesta dolorosa	60
Figura 1.14. Modificaciones moleculares, celulares y tisulares en el dolor crónico neuropático secundario a la lesión de un nervio periférico	63
Figura 1.15. Modelos animales de dolor neuropático	65
Figura 1.16. Escalera analgésica de la OMS	67
Figura 1.17. Mecanismos de transducción de los receptores opioides	69
Figura 1.18. Esquema representativo de las fases del síndrome general de adaptación	74
Figura 1.19. Alodinia mecánica inducida por la inyección intradérmica de noradrenalina en pacientes con SDRC tipo II	77
Figura 1.20. Aumento de la inervación simpática (<i>sprouting</i>) tras lesión de nervios periféricos	79
Figura 1.21. El microambiente de los nociceptores de la piel	80
Figura 1.22. Sensibilización de los nociceptores por el sistema simpatoadrenomedular	82
Figura 1.23. Rutas biosintéticas de los corticoesteroides	84
Figura 1.24. La glándula adrenal	85
Figura 1.25. Ruta biosintética de las CAs	89
Figura 1.26. Acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines	98
Figura 1.27. Localización de los subtipos de receptores α_2 adrenérgicos	100

Figura 1.28. Regulación de la presión arterial por diferentes subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos	101
Figura 1.29. Estructura química del MPV2426 y de la dexmedetomidina	102
Figura 3.1. Constricción crónica del nervio ciático	114
Figura 3.2. Valoración de la alodinia mecánica	117
Figura 3.3. Valoración de la alodinia al frío (test de la acetona)	118
Figura 3.4. Valoración de la hiperalgesia mecánica (test de <i>Randall y Selitto</i>)	118
Figura 3.5. Ensayo de coordinación motora	119
Figura 3.6. Administración intraplantar de fármacos	120
Figura 3.7. Cuantificación de las catecolaminas de la glándula adrenal	122
Figura 3.8. Protocolo para la obtención de un cultivo de las células cromafines de la médula adrenal de la rata	123
Figura 3.9. Cultivo de neuronas de los ganglios espinales (DRG) de la rata	125
Figura 3.10. Configuraciones de la técnica de <i>patch-clamp</i>	128
Figura 4.1. Evaluación comportamental en grupos control de la alodinia mecánica y al frío	132
Figura 4.2. Evaluación comportamental en animales CCI de la alodinia mecánica y al frío	133
Figura 4.3. Evaluación de la hiperalgesia mecánica en animales control (no operados) y CCI	134
Figura 4.4. Cambios inmunohistoquímicos en los ganglios espinales (L5) inducidos por la CCI del nervio ciático de la rata	135
Figura 4.5. Efecto de la CCI del nervio ciático sobre el peso corporal de los animales	136
Figura 4.6. Efecto de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío sobre el peso de las glándulas adrenales	137
Figura 4.7. Efectos de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío en el contenido de catecolaminas de la glándula adrenal	138
Figura 4.8. Efecto de la CCI del nervio ciático sobre los niveles plasmáticos de CAs en animales anestesiados	139
Figura 4.9. Efecto de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío sobre los niveles plasmáticos de CAs en animales sacrificados por concusión	139
Figura 4.10. Registro de corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas (sEPSCs) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales control y CCI	140
Figura 4.11. Efecto de la CCI y el estrés por frío sobre la magnitud	

de las corrientes nicotínicas en las células cromafines aisladas de la rata	141
Figura 4.12. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas en células cromafines aisladas procedentes de animales CCI y sus controles (control y estresados por frío)	142
Figura 4.13. Efecto de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío sobre las corrientes a través de los canales dependientes de voltaje en células cromafines en cortes de glándula adrenal de la rata	143
Figura 4.14. Efecto de SKF29661 sobre la alodinia mecánica en animales con lesión por CCI del nervio ciático	145
Figura 4.15. Efecto de SKF29661 sobre alodinia al frío en animales con lesión CCI del nervio ciático	146
Figura 4.16. Contribución de los receptores α_2 adrenérgicos al efecto antialodínico del SKF29661	147
Figura 4.17. Efecto de SKF29661 sobre la coordinación motora	147
Figura 4.18. Efecto de SKF29661 sobre el contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula adrenal de la rata	148
Figura 4.19. Efecto de SKF29661 sobre los niveles plasmáticos de adrenalina (A) y noradrenalina (NA)	149
Figura 4.20. Efecto de SKF29661 sobre las corrientes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje y la exocitosis de las células cromafines de rata en cortes de tejido de glándula adrenal	150
Figura 4.21. Efecto del SKF29661 sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de tejido de la glándula adrenal	151
Figura 4.22. Efecto de dexmedetomidina sobre la alodinia mecánica y al frío en ratas con CCI del nervio ciático	152
Figura 4.23. Efecto del atipamezol sobre el efecto antialodínico de la dexmedetomidina	153
Figura 4.24. Efecto de la dexmedetomidina sobre la coordinación motora	154
Figura 4.25. Efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de la rata	155
Figura 4.26. Efecto del atipamezol sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de rata en ausencia y presencia de dexmedetomidina	156
Figura 4.27. Efecto sobre las corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas en células cromafines de rata en ausencia y presencia de la dexmedetomidina	157
Figura 4.28. Efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes dependientes de voltaje de las células cromafines aisladas de la rata	158

Figura 4.29. Efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de las células cromafines en cortes de glándula adrenal	160
Figura 4.30. Efecto de la dexmedetomidina sobre los incrementos de la capacidad inducidos por la despolarización de la membrana de células cromafines en cortes de la glándula adrenal	161
Figura 4.31. Efecto de la dexmedetomidina sobre la respuesta secretora inducida por ACh en células cromafines (corte de tejido) de la glándula adrenal	161
Figura 4.32. Efecto de la dexmedetomidina y del MPV2426 sobre la presión arterial en ratas anestesiadas con isoflurano	162
Figura 4.33. Efecto del MPV2426 sobre la coordinación motora	163
Figura 4.34. Efecto de la administración sistémica de MPV2426 sobre la respuesta nocifensiva al estímulo mecánico	164
Figura 4.35. Efecto de la administración intraplantar de agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos (Dexmedetomidina y MPV2426) o antagonistas (Atipamezol) sobre la alodinia mecánica en ratas con lesión (CCI) del nervio ciático	164
Figura 4.36. Efecto de MPV2426 sobre el contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula adrenal de la rata	165
Figura 4.37. Efecto del MPV2426 sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la capacidad de la membrana de las células cromafines en cortes de glándula adrenal	166
Figura 4.38. Efecto del MPV2426 sobre las conductancias de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje en neuronas de los ganglios espinales (DRG) L5 y L6 de animales con lesión (CCI) del nervio ciático y sus controles	168
Figura 4.39. Efecto del MPV2426 sobre la excitabilidad de neuronas de los ganglios espinales (DRG) L5 y L6 de ratas con lesión (CCI) del nervio ciático y sus controles	169
Figura 4.40. Efecto de guanetidina sobre alodinia mecánica y al frío	170
Figura 4.41. Efecto de la guanetidina sobre el contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula adrenal de ratas	171
Figura 4.42. Efecto de la guanetidina sobre los niveles plasmáticos de adrenalina (A) y noradrenalina (NA)	172
Figura 4.43. Efecto de la administración intraplantar de adrenalina y de su coadministración con distintos antagonistas adrenérgicos sobre la sensibilidad mecánica nociceptiva en animales sanos	173
Figura 4.44. Efecto de la administración intraplantar de adrenalina y de su coadministración con antagonistas adrenérgicos sobre la alodinia mecánica	174

TABLAS

Tabla 1.1. Modelos animales para el estudio del dolor crónico	65
Tabla 1.2. Distribución y efectos de la activación de los distintos tipos de receptores α y β adrenérgicos	99
Tabla 1.3. Agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos	102
Tabla 3.1. Productos químicos utilizados en los procedimientos experimentales	112
Tabla 3.2. Materiales y equipos utilizados en los procedimientos experimentales	113

ABREVIATURAS

A	Adrenalina
AC	Adenilato ciclasa
ACh	Acetilcolina
ACTH	Hormona Adrenocorticotropa; <i>Adrenocorticotropic hormone</i>
ADME	Asta dorsal de la médula espinal
AHP	Posthiperpolarización; <i>Afterhyperpolarization</i>
AINE	Antiinflamatorios no esteroideos
AMPA	α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácidoisoxazolepropionico
Ati.	Atipamezol
ATP	Adenosín trifostato
AVP	Arginina-Vasopresina
AXO	Axotomía-autotomía; <i>axotomy-autotomy</i>
BC	Bradicinina
BDNF	Factor neurotrófico derivado del cerebro; <i>brain derived neurotrophic factor</i>
BHE	Barrera hematoencefálica
BK	Canal de K^+ dependiente de Ca^{2+} de elevada conductancia iónica
BSA	Albúmina sérica bovina
CAMKII	Proteína calcio/calmodulina cinasa
CAs	Catecolaminas
Ca_v	Canal de calcio dependiente de voltaje
CCI	Lesión por constricción crónica; <i>chronic constriction injury</i>
CCL-	Quimiocina proinflamatoria; <i>CC chemokine ligand</i>
CGRP	Péptido relacionado con el gen de la calcitonina; <i>calcitonin gene-related peptide</i>
CI ₅₀	Concentración inhibidora 50%
CISA	Canales iónicos sensibles a ácido
COX	Ciclooxigenasas
CRH	Hormona liberadora de Corticotropina; <i>Corticotropin-releasing hormone</i>
DA	Dopamina
DAPI	4',6-diamino-2-fenilindol
DE ₅₀	Dosis efectiva 50%
Dex.	Dexmedetomidina
DMEM	Medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco; <i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DOPA	Dihidroxifenilalanina
DOR	Receptor opioide β

DRG	Ganglio de la raíz dorsal; <i>dorsal root ganglia</i>
EAATs	Transportadores de aminoácidos excitadores; <i>excitatory amino acid transporter</i>
EGTA	Ácido-etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N,N',N'-teraacético
EMP	Efecto máximo posible
ENK	Encefalinas
eNOS	Óxido nítrico sintasa endotelial
EPSC	Corriente sináptica excitadora; <i>excitatory postsynaptic currents</i>
EPSP	Potencial sináptico excitador; <i>excitatory postsynaptic potential</i>
ERK	Proteínas quinasas reguladas por señales extracelulares; <i>extracellular signal-regulated kinases</i>
GABA	Ácido γ -aminobutírico
GC	Glucocorticoides
GFAP	Proteína fibrilar ácida de la glía; <i>glial fibrillary acidic protein</i>
GMPc	Guanosín monofosfato cíclico
HA	Hiperalgesia
HPA	Hipotálamo-Hipófisis-Adrenal; <i>hypothalamic-pituitary-adrenal</i>
HPLC	Cromatografía líquida de alta eficacia; <i>high performance liquid chromatography</i>
HVA	Alto umbral de activación; <i>hight voltage-activated</i>
I.P.	Vía intraperitoneal
i.pl.	Vía intraplantar
I _{ACh}	Corriente inducida por acetilcolina
I _{Ca} ²⁺	Corriente inducida por Ca ²⁺
I _{comm}	Modalidad de fijación de corriente
IL	Interleucina-
iNOS	Óxido nítrico sintasa inducible
JNK	Proteína c-Jun N-terminal cinasa; <i>c-Jun N-terminal kinase</i>
KA	Kainato
KCNK	Canales de potasio rectificadores de entrada
KO	Eliminación de uno o más genes; <i>Knockout</i>
KOR	Receptor opioide κ
K _v	Canal de potasio dependiente de voltaje
LAAD	L-aminoácido-aromático descarboxilasa
LC	<i>Locus coeruleus</i>
LVA	Bajo umbral de activación; <i>low voltage-activated</i>

mAChRs	Receptores muscarínicos
MAPKs	Proteínas quinasas activadas por mitógenos; <i>mitogen-activated protein kinases</i>
MOR	Receptor opioide μ
MPV2426	Fadolmidina o radolmidina
MRV	Médula rostral ventromedial
NA	Noradrenalina
nAChRs	Receptores nicotínicos
Na _v	Canal de sodio dependiente de voltaje
NGF	Factor de crecimiento nervioso; <i>nerve growth factor</i>
NMDA	N-metil-D-Aspartato
nNOS	Óxido nítrico sintasa neural
NO	Óxido nítrico
NT-3	Neurotrofina-3
NTS	Núcleo del tracto solitario
OMS	Organización Mundial de la Salud
PACAP	Péptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa
PBS	Solución salina tamponada con fosfato
PGs	Prostaglandinas
PI3K	Proteína fosfoinositido 3 cinasa
PKA	Proteína cinasa A
PKC	Proteína cinasa C
PKG	Proteína cinasa G
PLC	Fosfolipasa C
PNMT	Feniletanolamina N-metiltransferasa
Praz.	Prazosina
Prop.	Propranolol
PSL	Ligadura parcial del nervio ciático; <i>partial sciatic nerve ligation</i>
SDRC	Síndrome de dolor regional complejo
SGA	Síndrome general de adaptación
SGP	Sustancia gris periacueductal
SK	Canal de K ⁺ dependiente de Ca ²⁺ de pequeña conductancia iónica
SMP	Dolor “Mantenido” por el sistema nervioso simpático; <i>sympathetically maintained pain</i>
SNA	Sistema nervioso autónomo
SNC	Sistema Nervioso Central

SNI	Lesión nerviosa incompleta; <i>spared nerve injured</i>
SNL	Ligadura del nervio espinal; <i>spinal nerve ligation</i>
SNP	Sistema Nervioso Periférico
SNS	Sistema nervioso simpático
SOE	Sistema opioide endógeno
SP	Sustancia P
TEA	Tetraetilamonio
TG	Ganglio del trigémino; <i>trigeminal ganglion</i>
TH	Tirosina Hidroxilasa
TLRs	Receptores de tipo Toll; <i>Toll like receptors</i>
TNF- α	Factor de necrosis tumoral
TrKA	Tirosina cinasa A
TRP	Receptores de potencial transitorio; <i>transient receptor potential</i>
TRPA	Receptores de potencial transitorio de anquirina
TRPC	Receptores de potencial transitorio canónica
TRPM	Receptores de potencial transitorio de melastatina
TRPN	Receptores de potencial transitorio mecanorreceptor
TRPV	Receptores de potencial transitorio vaniloide
TTX	Tetrodotoxina
V ₅₀	Potencial de activación 50%
V _{comm}	Potencial de fijación en la modalidad de fijación de corriente
Veh.	Vehículo
VGLUTs	Transportadores vesiculares de glutamato; vesicular glutamate transporter
V _h	Potencial de fijación en la modalidad de fijación de voltaje
V _r	Potencial de membrana en “reposo”
α - RgIA	α -conotoxina RgIA
[Ca ²⁺] _i	Concentración citosólica de calcio libre
5-HT	Serotonina

RESUMEN

El dolor es el primer motivo de consulta en medicina humana. Puede ser un síntoma que alerta sobre la presencia de una enfermedad susceptible de tratamiento específico (dolor nociceptivo) o constituir una entidad patológica por sí misma (dolor neuropático), cuya característica fundamental es la alteración del procesamiento de la información nociceptiva. Si bien en el tratamiento del dolor nociceptivo el reto terapéutico consistiría actualmente en el logro de mayores niveles de seguridad de los fármacos analgésicos, en el tratamiento del dolor neuropático la situación actual viene marcada por la falta de eficacia. Existe pues un vacío terapéutico que demanda el desarrollo de nuevos fármacos que actúen sobre nuevas dianas terapéuticas. La hipótesis de partida de este trabajo fue la de considerar al dolor neuropático como un estresor capaz de originar una respuesta del sistema simpatoadrenomedular que, a su vez, contribuyera a la fenomenología dolorosa, cerrando así un círculo vicioso por el que el dolor y el estrés se alimentan de forma recíproca. Para ello hemos implementado la constricción crónica del nervio ciático de la rata como modelo experimental para la valoración de la alodinia mecánica y térmica como indicadores de dolor neuropático y consecuentemente la evaluación de fármacos potencialmente útiles en su tratamiento.

Nuestros resultados indican que dicho modelo de dolor comporta un aumento de la actividad simpatoadrenomedular que se manifestaría por el aumento de la transmisión sináptica (aumento de la inervación colinérgica y de la frecuencia de corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas; sEPSCs) en la unión nervio esplácnico-célula cromafín, una mayor expresión de receptores nicotínicos de membrana y el incremento de la exocitosis de catecolaminas por las células cromafines de la médula adrenal. Así mismo, la lesión del nervio ciático se asocia al aumento de la inervación catecolaminérgica en los ganglios espinales, el incremento de la excitabilidad de los somas de las neuronas nociceptivas primarias y el desarrollo de un tono adrenérgico algésico en la planta del pie de la extremidad afectada. Por otra parte, la administración sistémica de SKF29661, un inhibidor de la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), ejerce un efecto antialodínico mecánico y térmico probablemente relacionado con la inhibición de la síntesis y liberación de adrenalina por las células cromafines de la médula adrenal.

La principal diana farmacológica a la que hemos prestado atención en este trabajo ha sido el receptor α_2 adrenérgico. Los agonistas de estos receptores (dexmedetomidina, clonidina, etc.) ejercen un notable efecto analgésico modulando la transmisión sináptica entre la primera y segunda neuronas de la vía nociceptiva. Se trata de un efecto a nivel de la médula espinal que se observa de forma aislada (en ausencia de efecto sedante y simpaticolítico de acción central) tras la administración espinal de estos compuestos. Sin embargo, la existencia de receptores α_2 adrenérgicos moduladores de la liberación de noradrenalina por las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas postganglionares y de adrenalina por las células cromafines de la médula adrenal plantea la existencia de dianas periféricas de estos fármacos que pudieran contribuir a su efecto analgésico

en situaciones, como la que ejemplifica nuestro modelo experimental, en las que una mayor actividad simpática contribuyera a las manifestaciones dolorosas. Los resultados obtenidos tras la administración sistémica (I.P.) de dexmedetomidina y de MPV2426 (un agonista $\alpha 2$ adrenérgico de acción periférica) mostraron un efecto antialodínico a dosis no sedantes, lo que indicaría que se ejerce fuera del sistema nervioso central, mientras que los experimentos *in vitro* demostraron su capacidad para inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v y la exocitosis en las células cromafines a concentraciones clínicamente relevantes (100 nM). Es importante señalar que ambos efectos dependen de la activación de receptores $\alpha 2$ adrenérgicos, pues fueron prevenidos o revertidos por atipamezol. Adicionalmente, el hecho de que en los animales tratados con MPV2426 se observe un incremento del contenido adrenoglandular de catecolaminas es compatible con el mencionado efecto inhibidor de la liberación de catecolaminas. Tanto el efecto sobre el comportamiento nocifensivo como sobre la inhibición de la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis en las células cromafines es propio o se encuentra acentuado en los animales con dolor neuropático, en consonancia con un incremento de la actividad del sistema nervioso simpático en los mismos. Una de las más claras manifestaciones del incremento de dicha actividad a nivel de la médula adrenal es la mayor frecuencia de sEPSPs, que se vio drásticamente inhibida por la dexmedetomidina actuando probablemente sobre receptores $\alpha 2$ adrenérgicos localizados en las terminaciones del nervio esplácnico. En consecuencia, la médula adrenal presentaría propiedades idóneas para la actuación de los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos de una forma que podría denominarse como “dependiente de actividad”.

En conclusión, nuestros resultados permiten considerar a la PNMT y al receptor $\alpha 2$ adrenérgico de la médula adrenal como nuevas dianas para el tratamiento de aquellos cuadros de dolor en los que la activación del sistema simpatoadrenal desempeñe un papel fisiopatológico relevante.

ABSTRACT

Pain is the first reason for medical consultation in both human and veterinary medicine. It can be a symptom that alerts on the presence of a disease that can be specifically treated (nociceptive pain) or may constitute a pathological entity by itself (neuropathic pain), whose fundamental characteristic is the alteration of the processing of nociceptive information. While the therapeutic challenge in the treatment of nociceptive pain would be the attainment of higher levels of safety of the analgesic drugs, in the treatment of neuropathic pain the current situation is marked by the lack of effectiveness. There is therefore a therapeutic gap that demands the development of new drugs acting on new therapeutic targets. The starting hypothesis of this work was to consider neuropathic pain as a stressor capable of originating a response of the sympathoadrenomedullary system which, in turn, contributed to painful manifestations, hence closing a vicious circle whereby pain and stress feed to each other. To this end, we have implemented the chronic constriction injury (CCI) of the sciatic nerve of the rat as an experimental model for the evaluation of mechanical and thermal allodynia as indicators of neuropathic pain, and, consequently suitable for the evaluation of drugs potentially useful as analgesics.

Our results indicate that the CCI model of neuropathic pain involves an increase in sympathoadrenal activity as manifested by the enhancement of synaptic transmission (denser cholinergic innervation and a higher frequency of spontaneous excitatory postsynaptic currents; sEPSCs) in the splanchnic nerve-chromaffin cell junction, increased expression of plasma membrane nicotinic receptors, and augmented catecholamine exocytosis by chromaffin cells of the adrenal medulla. Likewise, sciatic nerve injury is associated with an increased number of catecholaminergic fibers in dorsal root ganglia, a higher excitability of the soma of primary nociceptive neurons, and the development of an algogenic adrenergic tone in the plantar surface of the affected hindlimb. On the other hand, the systemic (I.P.) administration of SKF29661, a phenylethanolamine- N-methyl transferase (PNMT) inhibitor, exerts a mechanical and thermal antiallodynic effect that is probably related to the inhibition of the synthesis and release of adrenaline by chromaffin cells of the adrenal medulla.

The main pharmacological target to which we have paid attention in this work has been the α_2 -adrenergic receptor. Conventional α_2 agonists (dexmedetomidine, clonidine, etc.) display a marked analgesic effect by modulating synaptic transmission between the first and second neurons of the nociceptive pathway. It is an action exerted at the spinal cord level that is not accompanied by any sedative and sympatholytic effect when those agents are administered through the spinal route. However, the existence of α_2 -adrenergic receptors modulating noradrenaline release by the nerve endings of postganglionic sympathetic fibers and adrenaline by chromaffin cells of the adrenal medulla suggests that also those peripheral targets might be involved in the analgesic effect of α_2

agonists in situations, such as the one exemplified by our experimental model, in which a greater sympathetic activity contributed to the painful syndrome.

The results obtained after I.P. administration of dexmedetomidine and MPV2426 (a peripheral-acting α_2 -adrenergic agonist) showed a mechanical and cold anti-allodynic effect at non-sedating doses, indicative of an action outside of the central nervous system, whereas in vitro experiments demonstrated the ability of those two compounds to inhibit Ca^{2+} entry through Ca_v channels and exocytosis in chromaffin cells at clinically relevant concentrations (100 nM). It is important to note that both effects depend on the activation of α_2 -adrenergic receptors, since they were prevented or reversed by atipamezole. In addition, the increase in the adrenoglandular content of catecholamines in animals treated with MPV2426 is consistent with the aforementioned inhibitory effect of catecholamine release. Both, the effect on the nocifensive behavior and on the inhibition of Ca^{2+} entry the associated exocytosis in chromaffin cells, are either characteristic or are more pronounced in animals with neuropathic pain, in accordance with an increase in the activity of the sympathetic nervous system. One of the more significant manifestations of increased adrenal medulla activity is the higher frequency of sEPSCs, which was drastically inhibited by dexmedetomidine probably acting on α_2 -adrenergic receptors located at the cholinergic terminals of the splanchnic nerve. Accordingly, the adrenal medulla would exhibit adequate properties for an "activity-dependent" action of α_2 -adrenergic agonists.

In conclusion, our results allow to propose adrenomedullary PNMT and α_2 -adrenergic receptors as new drug targets for the treatment of painful disorders in which activation of the sympathoadrenal system plays a relevant pathophysiological role.

I. INTRODUCCIÓN

“Toda ciencia viene del dolor. El dolor busca siempre la causa de las cosas, mientras que el bienestar se inclina a estar quieto y a no volver la mirada atrás”

Stefan Zweig

1.1. El dolor

A pesar de ser una experiencia universal, definir el dolor es difícil, por su carácter multidimensional y por el hecho de ser una sensación subjetiva.

Melzack y Cassey (1968) se refiere al dolor como una experiencia perceptiva que además de las vertientes sensorial (discriminativa) y afectiva (motivacional) comprendería también una vertiente cognitiva (evaluativa). En línea con esta definición, la más aceptada actualmente es la de la Asociación Mundial para el Estudio del Dolor (IASP) según la cual “el dolor es una experiencia sensorial y emocional desagradable asociada con un daño tisular, real o potencial, o descrita en términos de dicho daño”.

1.1.1. Clasificación

El dolor constituye una señal de alarma generada en un territorio corporal cualquiera que se transmite a través de un sistema aferente, normalmente inactivo, hasta distintas áreas corticales del sistema nervioso central (SNC), en las que sería percibido en términos de amenaza a la integridad del organismo, obligando a adoptar una conducta que evite mayor daño.

La complejidad del proceso doloroso ha propiciado el empleo de diferentes criterios para clasificarlo: i) duración: agudo y crónico; ii) causa: nociceptivo y neuropático; iii) localización: somático y visceral; central y periférico (**Figura 1.1**).

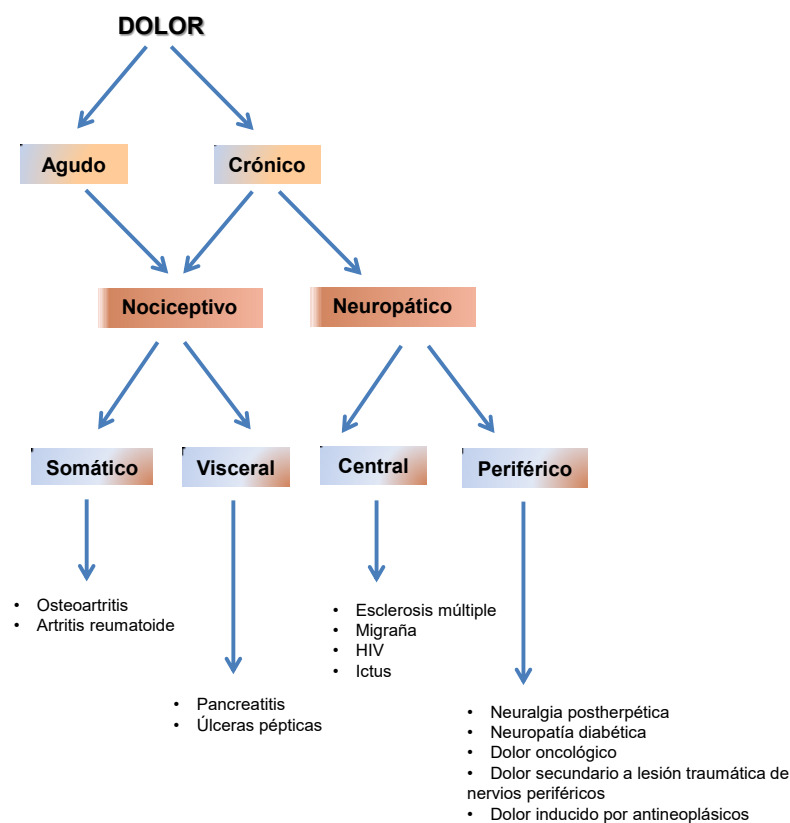


Figura 1.1. Clasificación del dolor. Tomada con modificaciones de Melnikova, 2010.

El dolor agudo aparece generalmente como consecuencia de un daño tisular y se desarrolla con un curso temporal limitado y relacionado con el proceso de reparación de la lesión causal. El dolor crónico se caracteriza por un curso temporal de larga duración y puede persistir tras la lesión que lo originó, perdiendo así su sentido protector.

El dolor nociceptivo, también denominado normal o fisiológico, cursa típicamente de forma aguda en relación con una lesión somática o visceral presentando una elevada correlación con la gravedad de la lesión. El dolor somático suele referirse a la piel, el músculo, los ligamentos, las articulaciones o los huesos. Se caracteriza por estar bien localizado y circunscrito a la zona dañada. Por su parte, el dolor visceral se refiere a los órganos internos y se caracteriza por una pobre localización que frecuentemente abarca territorios distantes del órgano lesionado (dolor referido) y, además, acompañarse de reacciones vegetativas (*Bonica, 2001*).

El dolor neuropático, también denominado anormal o patológico, tendría su origen en una alteración primaria de las vías nerviosas responsables de la sensación dolorosa. La diferencia principal entre éste y el nociceptivo es que puede experimentarse en ausencia de un estímulo nociceptivo (dolor espontáneo). El dolor neuropático se asocia o contribuye a la mayoría de los cuadros de dolor crónico. Aparece como resultado de la disfunción (habitualmente precedida por una lesión) del SNC o periférico (SNP) y comporta una alteración de la transducción, transmisión, modulación y/o percepción del dolor (ver epígrafe siguiente; *Jarvis, 2010; Pradhan et al., 2010*).

1.1.2. Neurobiología del dolor

La aparición de dolor es el resultado de cuatro procesos que acontecen de forma secuencial: i) la transducción, que comporta la activación de las terminaciones nerviosas periféricas (nociceptores) de las neuronas nociceptivas primarias por un estímulo nocivo (mecánico, térmico o químico), con la consiguiente generación de potenciales de acción; ii) la transmisión, en la que los potenciales de acción se propagan por las fibras nerviosas a través del soma hasta las terminaciones centrales de las neuronas nociceptivas en el asta dorsal de la médula espinal donde establecen sinapsis con la segunda neurona de la vía nociceptiva; iii) la modulación o proceso por el que la transmisión es modificada a distintos niveles, incluyendo la médula espinal y el tronco del encéfalo, y iv) la percepción, que es el proceso final por el que se crea la experiencia dolorosa (**Figura 1.2**).

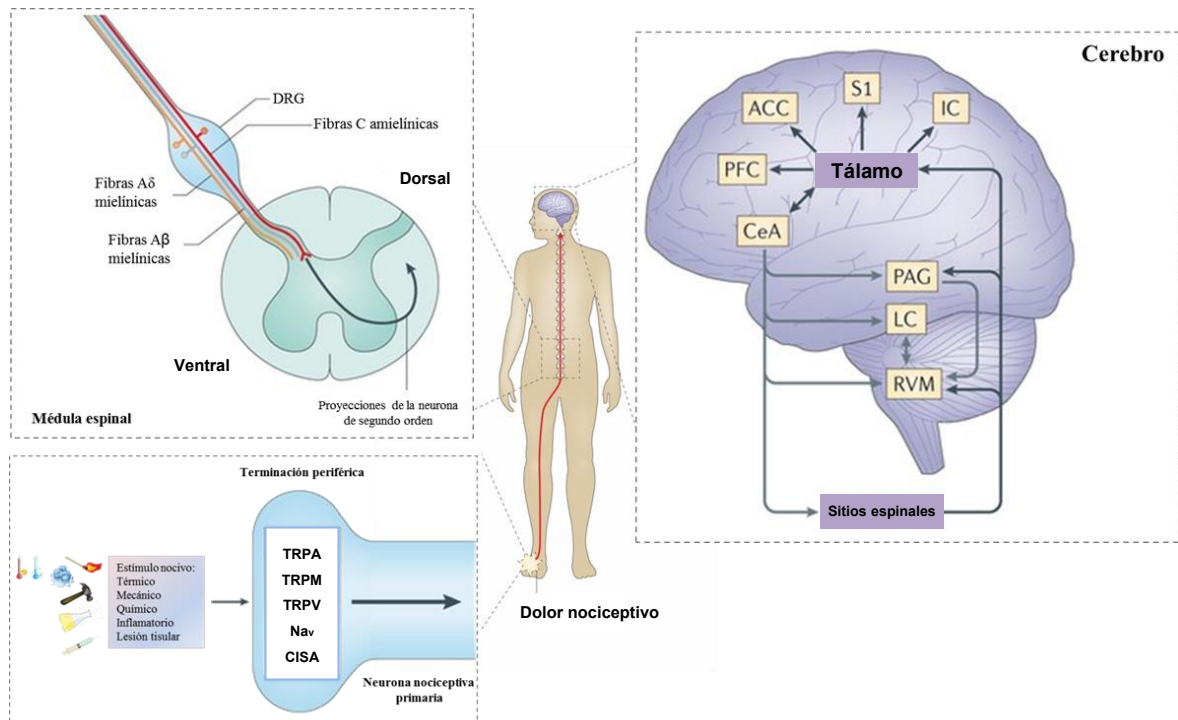


Figura 1.2. Fases del dolor. Se representan las distintas estructuras nerviosas implicadas en la transducción, la transmisión, la modulación y la percepción del dolor. En el *panel inferior izquierdo* se muestra la transducción dolorosa en respuesta a distintos tipos de estímulos nocivos (químicos, mecánicos, etc.) y los canales iónicos implicados en su conversión en señales eléctricas (potencial de receptor y potencial de acción) en las terminaciones nerviosas nociceptivas periféricas. En el *panel superior izquierdo* se muestra esquemáticamente la transmisión dolorosa y no dolorosa a lo largo de los axones de las fibras nociceptivas de tipo Aβ, C y Aδ, a través del soma de las neuronas situadas en el ganglio de la espinal (DRG) hasta las terminaciones centrales que realizan sinapsis con las neuronas localizadas en el asta posterior de la médula espinal. En el *panel derecho* se detalla el proceso de percepción en el que participan las neuronas de tercer orden que proyectan desde el tálamo a varias regiones corticales y subcorticales (flechas cortas): Corteza somatosensorial (S1), corteza cingulada anterior (ACC), amígdala (CeA), corteza insular (IC) y corteza prefrontal (PFC). Se representan también diversos núcleos del tronco cerebral que contribuyen a la modulación bidireccional del dolor y que envían sus proyecciones hasta los núcleos del tálamo (flechas largas), incluyendo la sustancia gris periacueductal (SGP), el *locus coeruleus* (LC) y la médula rostral ventromedial (MRV). Tomada con modificaciones de *Grace et al., 2014*.

La transmisión sináptica en la médula espinal está regulada por células gliales e interneuronas locales así como por las proyecciones que descienden desde el tronco encefálico. Estas proyecciones son fundamentalmente inhibitorias y se sirven de neurotransmisores como los péptidos opioides, la noradrenalina (NA) y la serotonina (5-HT), que actúan tanto a nivel presináptico (neurona nociceptiva primaria) como postsináptico (neurona nociceptiva secundaria). Otras sustancias con carácter inhibitorio serían la glicina y el ácido γ -aminobutírico (GABA), que fundamentalmente provendrían de interneuronas locales (*Jänig, 2009; Takazawa et al., 2017*).

1.1.3. Transducción

Los nociceptores cutáneos son terminaciones periféricas de neuronas pseudobipolares que tienen el soma en los ganglios espinales o DRG. Presentan tres propiedades básicas: un alto umbral de activación, la capacidad de codificar la intensidad de los estímulos en el rango nocivo y una falta de actividad espontánea en ausencia de estimulación nociva (*Romera et al., 2000*).

La activación de los nociceptores puede realizarse directamente (estímulos mecánicos o térmicos), pero frecuentemente se requiere de mediadores químicos (ATP, H^+ , K^+ , etc.). Mediante técnicas de clonación y bloqueo de genes (animales *knockout*; KO) se han identificado diferentes tipos de proteínas capaces de detectar estímulos térmicos de intensidad diversa (temperaturas extremas; $> 40^{\circ}C$ o $< 15^{\circ}C$); la mayoría de los nociceptores son quimioceptores que responden a sustancias muy diversas capaces tanto de activarlos como la bradicinina (BC), la capsaicina o la sustancia P (SP), además de las ya mencionadas, como de ejercer un efecto sensibilizador respecto de las anteriores (algunas prostaglandinas, PGs, y leucotrienos; **Figura 1.3**).

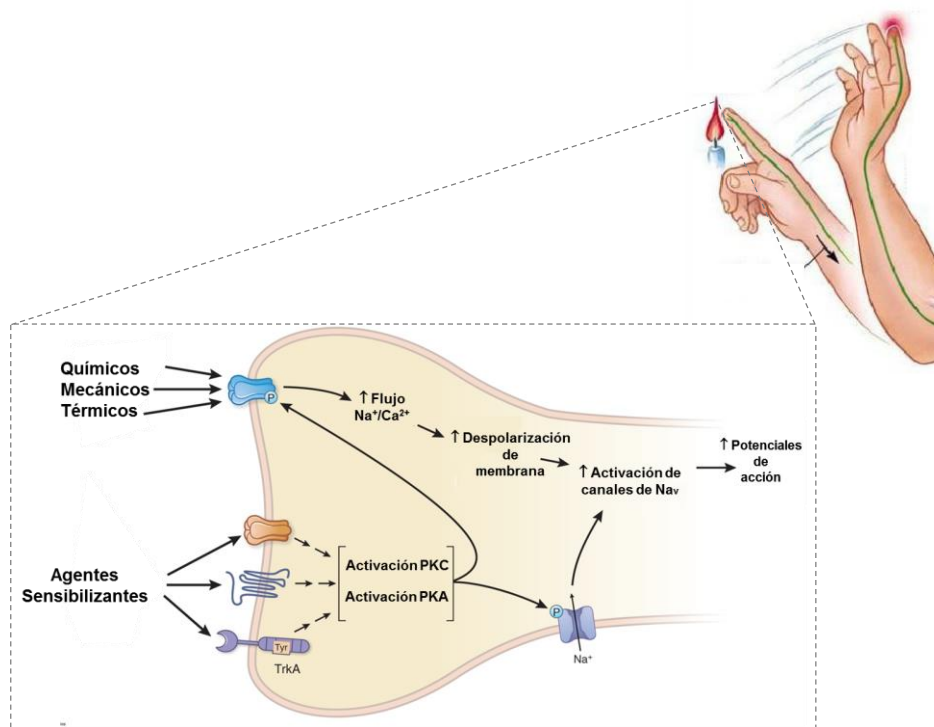


Figura 1.3. La transducción del dolor. Implica la detección de un estímulo térmico, químico o mecánico y su conversión en una señal eléctrica (despolarización de la membrana) en la terminación nerviosa de la neurona nociceptiva. En este proceso resulta esencial la participación de muy diferentes canales iónicos: canales CISA, P2X/P2Y y B1/B2 que responden a cambios de pH, ATP y bradicinina, respectivamente; canales que responden a cambios de presión, y TRPV que responden a cambios de temperatura. La despolarización inducida por la señal nociceptiva puede alcanzar el umbral de activación de los canales de sodio dependientes de voltaje y desencadenar un potencial de acción que se propagará a lo largo del axón. Tomada con modificaciones de *Griffin y Clifford, 2012*.

A diferencia de lo que ocurre en el resto del cuerpo, cuando los estímulos dolorosos son originados en la región orofacial, la información nociceptiva se transmite a través de los componentes del nervio trigémino, es decir, de sus ramas V1 (oftálmica), V2 (maxilar) y V3 (mandibular). Los cuerpos de las neuronas nociceptivas primarias están localizados en el ganglio del trigémino (TG) y sus prolongaciones centrales terminan en el núcleo espinal del trigémino. Desde este núcleo parten fibras que se cruzan formando el lemnisco trigeminal y ascienden hasta alcanzar el tálamo a partir del que salen proyecciones que transmiten información del conjunto del organismo hacia la corteza cerebral (*Goto et al., 2016; Weiss et al., 2017*).

1.1.3.1. Canales TRP

Los canales TRP (receptores de potencial transitorio, *Transient Receptor Potential*; Montell et al., 1989) son canales catiónicos que permiten el flujo de Ca^{2+} y Na^{+} que desempeñan un importante papel en la fisiología sensorial mediante la detección de una enorme variedad de estímulos: mecánicos, térmicos, químicos, cambios en el gradiente osmótico, etc. En función de la similitud entre sus secuencias, los canales TRP se han dividido en siete subfamilias: TRPC (canónica), TRPM (melastatina), TRPV (vaniloide), TRPA (anquirina), TRPN (mecanorreceptor), TRPP (policistina) y TRPML (mucolipina; Nilius et al., 2005). La mayoría de los canales TRP están formados por la unión de cuatro subunidades de la misma o diferente subfamilia. Cuatro canales de la subfamilia TRPV podrían estar involucrados en la detección de temperaturas intermedias y altas (entre 23 y 52 °C). Así, el canal TRPV1 responde a temperaturas superiores a 42 °C (Caterina et al., 1997), el TRPV2 lo hace a las temperaturas superiores a 52 °C, en tanto que el TRPV3 y el TRPV4 reconocen estímulos térmicos entre 23 y 39 °C y entre 27 y 34 °C, respectivamente (Smith, 2002; Güler et al., 2002). Otros canales TRP participan en la percepción del frío inocuo (TRPM8, con un rango de temperatura entre 15 y 30 °C) y del frío nocivo (TRPA1, temperaturas inferiores a 15 °C; Reid et al., 2002; **Figura 1.4**).

Los canales TRPV1 fueron inicialmente identificados en las neuronas DRG, el TG y la médula espinal (Caterina y Julius, 2001), si bien presentan una amplia distribución que incluye, entre otras localizaciones los corpúsculos de Meissner de los queratinocitos de la piel (Pare et al., 2001; Southall et al., 2003), mastocitos, y el subepitelio de las vísceras huecas (Birder et al., 2001; 2002). Este canal se comporta como un detector polimodal ya que es activado por temperatura, voltaje, pH ácido y compuestos vaniloides como la capsaicina y la anandamida. (Caterina et al., 1999; Gunthorpe et al., 2008; Benham et al., 2003). El canal TRPV1, se regula de forma dependiente e independiente de muy diversos agentes pronociceptivos y proinflamatorios como los H^{+} (pH 5,5 e inferior), el factor de crecimiento nervioso (NGF; *Nerve Growth Factor*), la BC, algunas PGs y derivados de la lipo-oxigenasa y el ATP (Caterina et al., 1999; Rang y Dale, 2008). Por todo ello, al TRPV1 se le atribuye un papel esencial tanto en la integración de estímulos nocivos como en la hiperalgesia térmica (Tominaga, 2000). Por otra parte, la exposición repetida a capsaicina impide la transmisión dolorosa al inducir la desensibilización del receptor ejerciendo, en consecuencia un efecto analgésico (Yong et al., 2017).

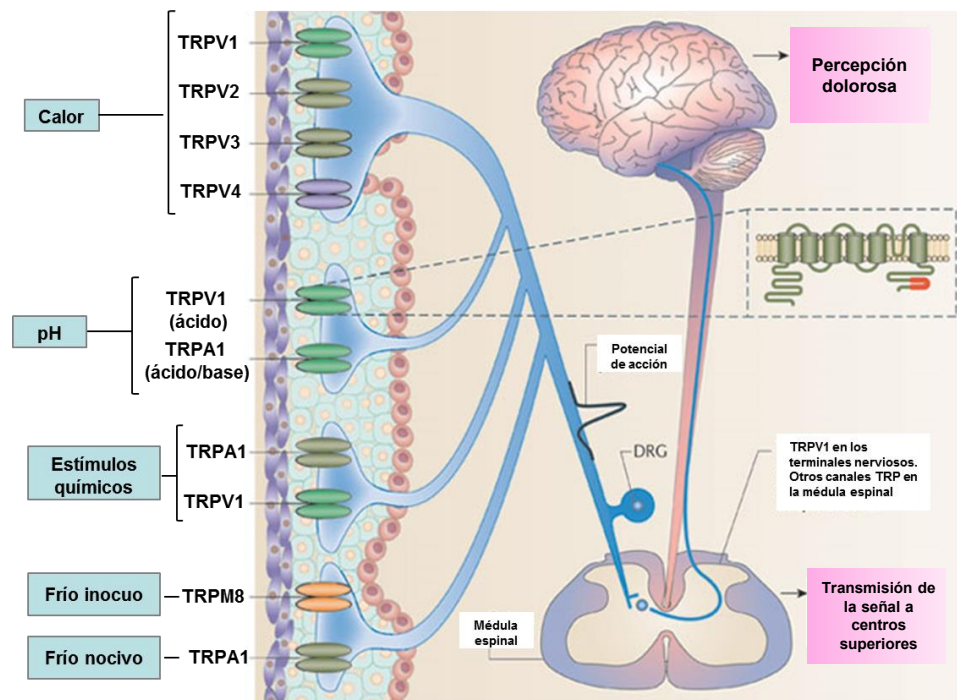


Figura 1.4. Canales TRP. Las neuronas sensitivas expresan múltiples variedades de canales TRP capaces de responder a muy diferentes estímulos. Calor: canales TRPV1, TRPV2, TRPV3 y TRPV4; frío: canales TRPM8 y TRPA1; pH ácido: TRPV1 y TRPA1; estímulos químicos: TRPV1 y TRPA1. Véase el texto para obtener detalles adicionales. Tomada con modificaciones de *Moran et al., 2011*.

Los canales TRPV2 se expresan en las terminaciones nerviosas de las neuronas y en los ganglios espinales y del TG (*Xu et al., 2002*), en los que actúan como transductores de alto umbral térmico (superiores a 52 °C; *Tominaga, 2000*). La aplicación reiterada de estímulos en el rango de activación produce la desensibilización del canal, de forma análoga a lo observado en los nociceptores (*Caterina et al., 1999*). Los canales TRPV3 se activan en un rango de temperatura intermedia, correspondiente al calor inocuo (23-39 °C). Al igual que otros canales TRP térmicos, pueden activarse también por agentes químicos como los presentes en el orégano y en el alcanfor. Los canales TRPV4 se activan tanto por temperaturas inocuas, entre 27-34 °C, como por soluciones hipotónicas (*Watanabe et al., 2002*). Curiosamente estos canales se desensibilizan al exponerse a estímulos térmicos repetidos, lo que determina un incremento de su umbral de activación hasta valores de 52 °C. La localización de este canal es variada, encontrándose en el hipotálamo, en el sarcolema de las fibras musculares del corazón, los islotes β pancreáticos y en células del sistema inmune como las células de Kupffer del hígado, las células de Langerhans de la piel y los macrófagos alveolares en el pulmón (*Watanabe et al., 2002; Perálvarez-Marín et al., 2013*).

Las bajas temperaturas pueden ser clasificadas según su intensidad en inocuas y nocivas. Las primeras varían en el rango de 15-30 °C, mientras que las nocivas corresponden a temperatura

inferiores a 15 °C. El canal TRPM8 es el principal transductor del frío inocuo (Mckemy *et al.*, 2005). Este receptor puede ser modulado por agentes químicos como el mentol, el eucalipto y la icilina que ejercen un efecto sensibilizador (incremento de la respuesta), mientras que el Ca^{2+} citosólico, a través de la calmodulina o la α -actinina, determinando la disminución de la actividad del canal (adaptación) de forma progresiva conforme se eleva su concentración (McCoy *et al.*, 2011).

El canal TRPA1 o ANKTM1 se ha asociado con la transducción del frío nocivo; además de por el estímulo térmico, su apertura es favorecida por la BC y otros péptidos de naturaleza inflamatoria, así como sustancias presentes en el ajo, la mostaza y la canela (Bandell *et al.*, 2004). Ello sugiere que el canal TRPA1 participaría en la señalización del dolor mediando la hipersensibilidad a los estímulos térmicos (hiperalgesia), propia de los procesos inflamatorios (Obata *et al.*, 2005; **Figura 1.5**).

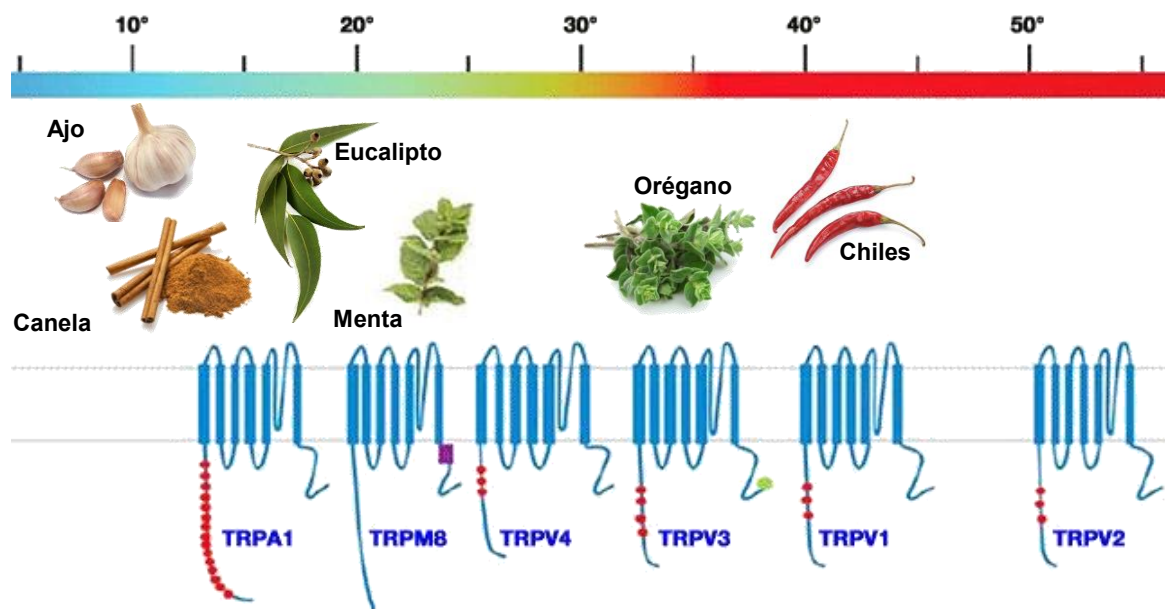


Figura 1.5. Esquema del rango de temperaturas de activación de los canales TRP. Se representa el rango de activación de los canales TRP termosensibles que abarca desde 10 hasta 52 °C. También se representan algunas de los principales productos naturales cuyos componentes son activadores de estos canales. Se ha descrito que cada uno de estos canales está presente al menos a nivel transcripcional en los DRG o neuronas trigeminales; sin embargo, algunos están expresados fuera del sistema nervioso sensitivo sugiriendo papeles fisiológicos alternativos en esas estructuras. Tomada con modificaciones de Obata *et al.*, 2003.

1.1.3.2. Mecanociceptores

Los nociceptores pueden ser activados por la fuerza mecánica resultante de la presión directa, la deformación del tejido o de los cambios en la osmolaridad, lo que posibilita percibir el tacto, la presión profunda, la distensión de una víscera o la inflamación (Julius *et al.*, 2001).

A nivel molecular se han propuesto varios candidatos que podrían mediar la transducción mecanoeléctrica, entre los que se encuentran los canales TRPV2 (*Caterina et al., 1999; Muraki et al., 2003*), los canales iónicos sensibles a ácido (CISA; véase más adelante) y canales de K^+ de la familia KCNK: KCNK2 (TREK-1) y KCNK4 (TRAAK) que se expresan en las fibras nerviosas nociceptivas y pueden ser modulados por numerosos estímulos fisiológicos y farmacológicos (*Hu et al., 2006*). Los ratones KO para estos canales muestran anormalidades en la sensibilidad a la presión, el calor y el frío (*Noel et al., 2009*).

1.1.3.3. Quimioceptores

La lesión tisular provoca la liberación y/o síntesis local de numerosos agentes químicos que actúan como mediadores de la respuesta inflamatoria. Entre ellos cabe mencionar a la BC, las PGs, los leucotrienos, la 5-HT, la histamina, la SP, los H^+ y algunos radicales libres. Algunos de estos agentes pueden activar o sensibilizar de forma directa el nociceptor, mientras que otros actúan de forma indirecta por medio de las células del sistema inmune. Estos mediadores químicos liberados durante la inflamación pueden tener efectos sinérgicos sobre la respuesta del nociceptor (*Arbaiza, 2005*).

1.1.3.3.1. Receptores de bradicinina

La BC es el inductor endógeno más potente del dolor agudo (*Brown et al., 2010*). Los receptores de BC se clasifican en B1 y B2. En condiciones normales el receptor B1 está ausente en la mayoría de los tejidos del cuerpo, pero su expresión se induce en el contexto de la inflamación. El receptor B2, sin embargo, se considera un receptor de carácter constitutivo y su expresión es ubicua en los tejidos del cuerpo, aunque varios estudios muestran que puede también inducirse bajo condiciones inflamatorias. La estimulación de los receptores B2 de las neuronas nociceptivas provoca la liberación de Ca^{2+} desde los reservorios intracelulares así como el cierre de canales de K^+ responsables de una corriente de tipo M lo que resulta en la generación de señales nociceptivas. La BC a través de receptores localizados en el endotelio y el músculo liso vascular juega un papel importante en la vasodilatación (activación de la fosfolipasa C, PLC) y/o vasoconstricción (inhibición de la adenilato ciclasa, AC), así como un aumento de la permeabilidad vascular característicos de la inflamación (*Dalsgaard et al., 2009*).

1.1.3.3.2. Canales CISA

Los canales CISA (canales iónicos sensibles a ácido) pertenecen a la familia de canales de Na^+ epiteliales/degenerina independientes de voltaje y sensibles a amilorida (*Kellenberger et al., 2002*). Estos canales parecen jugar un papel esencial tanto en la génesis de la sensación de dolor agudo a nivel periférico como en el desarrollo de la sensibilización central (*Guang Li et al., 2016*). La acidosis tisular se produce en muy diversos estados fisiológicos y fisiopatológicos,

incluyendo la inflamación, infección, isquemia, cáncer, y el estrés metabólico (Reeh *et al.*, 1992; Mantyh *et al.*, 2002). La disminución del pH en el tejido inflamado se correlaciona con la hiperalgesia mecánica y térmica (Steen *et al.*, 1993). La presencia de H^+ en el medio extracelular activa también corrientes catiónicas mediadas por canales TRPV1 y CISA en el soma de neuronas DRG (Caterina *et al.*, 2001).

1.1.3.3.3. Receptores de histamina y 5-HT

Tanto la histamina como la 5-HT son liberadas mediante exocitosis por los mastocitos junto con enzimas (hidrolasas ácidas, fosfolipasas, triptasa y otras proteasas), citocinas (interleucina-1, interferón, etc.), mediadores lipídicos (leucotrienos, PGs, factor activador de plaquetas y ATP (Johnson y Krenger, 1992; Gurish y Boyce., 2002).

La histamina es capaz de unirse a 4 subtipos (H1-H4) de receptores acoplados a proteínas G. Sólo tres de ellos (H1-H3) se expresan en el sistema nervioso. Las principales acciones en los seres humanos son la estimulación de la secreción gástrica, la contracción del músculo liso intestinal, vasodilatación y el aumento de la permeabilidad vascular cutáneas (Rang y Dale, 2008). Los receptores de 5-HT se clasifican en 7 subfamilias. El subtipo 5-HT3 consiste en un canal iónico mientras que los subtipos 5-HT1, 5-HT2, 5-HT4, 5-HT5, 5-HT6 y 5-HT7 se encuentran acoplados a proteínas G. Las principales funciones de la 5-HT son la regulación del apetito, el estado de ánimo, el sueño mediante la producción de melatonina, la contracción vascular o la liberación de distintas hormonas, etc. (Berumen *et al.*, 2012).

Ambas aminas participarían en la transducción tanto del dolor somático como visceral, aumentando en el último caso la excitabilidad de las fibras nerviosas aferentes de los nervios vago, esplácnico y mesentéricos (Barbara *et al.*, 2004; Traver *et al.*, 2010).

1.1.3.3.4. Receptores de glutamato

El glutamato es el principal neurotransmisor excitador del SNC e interviene en procesos tan importantes como la cognición, la memoria y el aprendizaje (Nicoll y Malenka, 1995; Bliss y Collingridge, 2013). La investigación sobre estos procesos, ha conducido a una comprensión general de las funciones de la sinapsis glutamatérgicas, incluidas las que participan en la transmisión nociceptiva a nivel de la médula espinal.

Los receptores de glutamato se clasifican en dos familias fundamentales: los receptores ionotrópicos y los receptores metabotrópicos. Los receptores ionotrópicos se subdividen en receptores NMDA (N-metil-D-aspartato), AMPA (α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-ácido isoxazolepropionico) y kainato (KA). El receptor AMPA contribuye principalmente a la transmisión sináptica rápida (Anggono *et al.*, 2012), mientras que el receptor NMDA desempeña un papel crítico en el desencadenamiento de la potenciación perdurable (LTP; *long-term potentiation*;

Collingridge et al., 2017). Los receptores de KA contribuyen también a la transmisión nociceptiva participando en la regulación presináptica de la neurotransmisión glutamatérgica. Los receptores metabotrópicos de glutamato activan indirectamente los canales iónicos de la membrana plasmática a través de una cascada de señalización que implica a proteínas G y al igual que los ionotrópicos participarían en la señalización del dolor en las astas dorsales de la médula espinal (*Koga et al., 2016*).

Una vez liberado, el glutamato es recaptado al objeto de evitar que alcance niveles tóxicos en el espacio extracelular y poner fin a la transmisión glutamatérgica excitadora. Se ha descrito la existencia de dos familias de transportadores de glutamato: los transportadores de aminoácidos excitadores (EAATs; *excitatory amino acid transporter*) y los transportadores vesiculares de glutamato (VGLUTs; *vesicular glutamate transporter*). Hasta el momento se han identificado tres tipos de VGLUTs (VGLUT 1-3), que se expresarían en diferentes subpoblaciones de neuronas de los ganglios espinales. El VGLUT2 es el transportador más abundante, encontrándose en gran número de neuronas sensitivas tanto viscerales como somáticas (*Langerstrom et al., 2007; Brumovsky et al., 2012*) de muy diferentes tamaños (grandes, pequeñas y medianas). Por el contrario, el VGLUT1 se expresa en las subpoblaciones de tamaño grande y mediano, mientras que el VGLUT3 lo haría en las de menor tamaño. De los EAATs se conocen cinco subtipos, codificados por cinco genes diferentes (*Huang y Bergles, 2004*). En humanos, a estos transportadores se les ha denominado EAATs 1-5, mientras que en el resto de mamíferos la nomenclatura es diferente: i) GLAST (equivalente al EAAT1 humano; *Storck et al., 1992*) está localizado principalmente en células de la glía (astrocitos) siendo el transportador de glutamato que aparece durante el desarrollo del SNC (*Furuta et al., 1997a*). En el adulto aparece en la glía del cerebelo y con menor expresión en el resto del cerebro y en la médula espinal; ii) GLT-1 (equivalente a EAAT2 humano; *Pines et al., 1992*) localizado en la astrogliá y neuronas (*Chen et al., 2002*). Es el responsable de la recaptación del 90% del glutamato en el tejido adulto (*Tanaka et al., 1997*); iii) EAAC1 (equivalente a EAAT3 humano; *Kanai y Hediger, 1992*) es un transportador con una alta expresión en las membranas neuronales postsinápticas; iv) EAAT4, que presenta la misma nomenclatura en humanos y en el resto de animales, y cuya expresión está limitada a las células de Purkinje del cerebelo (*Fairman et al., 1995*) y v) EAAT5 que, al igual que el anterior, recaptación del 90% del glutamato en el tejido adulto (*Tanaka et al., 1997*); iii) EAAC1 (equivalente a EAAT3 humano; *Kanai y Hediger, 1992*) es un transportador con una alta expresión en las membranas neuronales postsinápticas; iv) EAAT4, que presenta la misma nomenclatura en humanos y en el resto de animales, y cuya expresión está limitada a las células de Purkinje del cerebelo (*Fairman et al., 1995*) y v) EAAT5 que, al igual que el anterior, posee igual nomenclatura en humanos y animales y se expresa en células fotorreceptoras y bipolares de retina (*Arriza et al., 1997*; **Figura 1.6**).

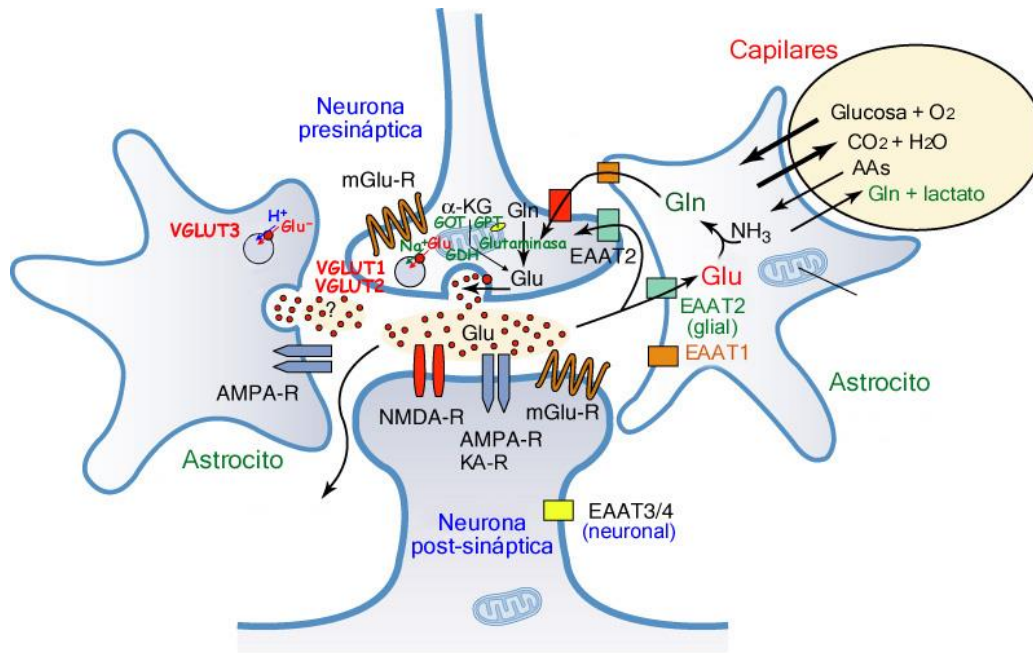


Figura 1.6. La sinapsis glutamatérgica. La neurona postsináptica contiene receptores de glutamato, tanto ionotrópicos (AMPA y NMDA) como metabotrópicos, y transportadores de glutamato (EAAT3 y EAAT4). Alrededor de la sinapsis están los procesos astrocíticos que cuentan con transportadores de glutamato (EAAT1 y EAAT2), transportadores de glutamina (cuadrado naranja), receptores de glutamato e incluso vesículas llenas de glutamato. La neurona presináptica, presenta transportadores de glutamato (EAAT2, rectángulos verdes), mitocondrias (azul), glutaminasa (punto amarillo) y receptores metabotrópicos de glutamato. Tomada con modificaciones de Bjørnar *et al.*, 2012.

1.1.3.3.5. Receptores de ATP

El ATP desempeña importantes funciones intracelulares. Se considera el elemento central del metabolismo energético participando en numerosos procesos, entre los que se encuentran la síntesis de macromoléculas o el mantenimiento de los gradientes iónicos de membrana. Además, es el precursor estructural de los ácidos nucleicos y regula la actividad de una gran diversidad de enzimas. En la actualidad, no existe ninguna duda sobre la existencia de un sistema de señalización purinérgica extracelular en prácticamente todos los tejidos y sistemas del organismo, en los que regulan numerosas funciones (neurotransmisión, secreción endocrina y exocrina, respuesta inmune, inflamación, transducción mecanosensorial, agregación plaquetaria, vasodilatación, proliferación, diferenciación, migración y muerte celular; Abbracchio y Burnstock, 1998; Burnstock y Knight, 2004).

Los receptores específicos de nucleótidos, o receptores P2, se clasifican en dos familias en función de su estructura y de los mecanismos de transducción de la señal: los receptores P2X, que son canales iónicos activados por ligando, y los receptores P2Y, que son receptores metabotrópicos acoplados a proteínas G (Abbracchio y Burnstock, 1994). Se han clonado y caracterizado farmacológicamente siete subtipos de receptores P2X (P2X1-P2X7) y ocho subtipos de receptores P2Y (P2Y1, P2Y2, P2Y4, P2Y6, P2Y11, P2Y12, P2Y13 y P2Y14; Kim *et al.*, 2001; Ormond *et*

al., 2006; Burnstock, 2007).

Los receptores P2X son canales no selectivos a cationes que permiten el paso de iones como el Ca^{2+} , Na^+ y K^+ a través de la membrana plasmática. Tras su activación provocan la despolarización de la membrana que a su vez conduciría a la activación de canales de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v). El tiempo necesario para que se produzca la respuesta es muy corto desempeñando un papel muy importante en la transmisión neuronal rápida y en la contracción del músculo liso. La entrada de Ca^{2+} a través de los receptores P2X y de los Ca_v puede activar numerosas vías de señalización, entre las que se encuentran las CaMKII (calcio/calmodulina cinasa) y PKCs (proteínas cinasas C; *Leon et al.*, 2006; 2007).

Los receptores P2Y están acoplados principalmente a las dos vías principales de transducción de señalización metabotrópicas: la hidrólisis de los lípidos de inositol por la PLC (*Communi et al.*, 2001b; *Zhang et al.*, 2002; *Kim et al.*, 2005) y la activación o inhibición de la AC (*Sen et al.*, 1996; *Sunahara et al.*, 1996; *Defer et al.*, 2000).

Existen múltiples pruebas de la participación del ATP en la señalización dolorosa tanto a nivel de las terminaciones nerviosas periféricas, soma y terminaciones centrales de las neuronas espinales como de las neuronas nociceptivas secundarias de la médula espinal. El ATP responsable de esta señalización tiene origen neuronal y glial, localizándose en vesículas de secreción en los somas y terminaciones nerviosas centrales de las neuronas espinales, así como de las células de Schwann de los nervios periféricos, las células satélites en los ganglios espinales y los astrocitos de la médula espinal. Adicionalmente, el ATP puede proceder del interior de cualquier célula dañada y de las células del sistema inmune (macrófagos y astrocitos fundamentalmente) presentes en un foco inflamatorio. Entre los receptores purinérgicos ionotrópicos, las neuronas sensitivas expresan predominantemente los formados por las subunidades P2X2 y P2X3. El receptor P2X3 está implicado en la percepción del dolor crónico asociado a procesos inflamatorios somáticos y viscerales y a la lesión de nervios periféricos (*Kennedy et al.*, 2003; *Bian et al.*, 2003; *Dorn et al.*, 2004). En ratones KO para el receptor P2X3 se ha observado una disminución del comportamiento nocifensivo, en distintos modelos de dolor neuropático (*Cockayne et al.*, 2000; *Souslova et al.*, 2000).

En las células gliales los receptores mayormente expresados son los P2X4 y P2X7 (*Burnstock*, 2007). Se cree que la liberación de ATP que tiene como origen la muerte neuronal activaría al receptor P2X4, lo que induciría a la liberación del factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF; *Brain-derived neurotrophic factor*) por parte de la microglía (*Coull et al.*, 2005). Este factor actuaría sobre las neuronas adyacentes alterando la expresión de los transportadores de Cl^- con la consiguiente alteración de la transmisión GABAérgica inhibitoria. El receptor P2X7 interviene en la respuesta inmune mediante la regulación de la expresión de citocinas

proinflamatorias como el factor de necrosis tumoral (TNF- α) o la interleucina-1 β (IL-1 β ; *Brough et al., 2003; Bulanova et al., 2005*). En los últimos años se ha identificado en otros muchos tejidos, p.ej., en las glándulas salivares; en osteoblastos, fibroblastos e incluso en el sistema nervioso, donde podría estar implicado en procesos tan dispares como la proliferación celular, la liberación de neurotransmisores o la activación de microglía y astrocitos (*Miras-Portugal et al., 2003; Hervas et al., 2003; 2005*). El receptor P2X7 ha sido también localizado alrededor de las placas de la proteína β -amiloide en modelos de ratón de la enfermedad de Alzheimer (*Parvathenani et al., 2003*). Por ello, podría ser una posible diana farmacológica para el tratamiento de dicha patología, así como de otras alteraciones nerviosas como el dolor neuropático o la esclerosis múltiple (*Sperlagh et al., 2006*).

Los receptores P2Y también están involucrados en la percepción del dolor. Así, en sistemas de expresión heteróloga, se ha comprobado que la activación del receptor P2Y1 induce la fosforilación dependiente de PKC del canal TRPV1, disminuyendo el umbral de activación por temperatura de dicho receptor desde los 42 °C a los 35 °C (*Tominaga et al., 2001*). Por otra parte, estudios realizados con animales KO para los receptores P2Y1 y TRPV1 han puesto de manifiesto que el receptor P2Y2 sería el responsable de la hiperalgesia térmica inducida por ATP (*Moriyama et al., 2003*).

1.1.4. Transmisión

Clásicamente, las neuronas sensitivas se han clasificado atendiendo a la velocidad de conducción de sus fibras (relacionada con el diámetro del axón y su mielinización) y al diámetro de sus somas. La mayoría de las neuronas nociceptivas poseen axones de pequeño diámetro amielínicos (fibras C; velocidad de conducción de 0,4-1,4 m/s) o mielinizados (fibras A β y A δ ; velocidad de conducción de 5-30 m/s). Típicamente se ha asumido que las fibras A β y C median respectivamente el primer y segundo dolor, siendo el primero rápido y agudo y el segundo más retardado y difuso. Por su parte, las fibras A δ participarían en la transmisión nociceptiva en condiciones patológicas (*Julius y Basbaum, 2001; Djouhri et al., 2004; Woolf et al., 2007; Figura 1.7*).

Las fibras nociceptivas se han clasificado también en razón al tipo de estímulo al que responden: mecánico (M), calor (H) y frío (C; *Kumazawa et al., 1996*). Las fibras que responden a estímulos mecánicos y térmicos (nociceptores polimodales) son fundamentalmente del tipo C, denominándose C-MH cuando responden al estímulo mecánico y al calor, C-MC si responden al estímulo mecánico y al frío y C-MHC cuando responden a los tres tipos de estímulo. Las fibras A δ , son predominantemente sensibles al calor (AH), a estímulos mecánicos (AM) o a ambos estímulos A-MH (*Cain et al., 2001*). La participación de cada tipo de fibras en la percepción del dolor implica una determinada especialización de los sistemas de transducción a nivel molecular así

como un patrón de conectividad específico de las neuronas periféricas con las centrales.

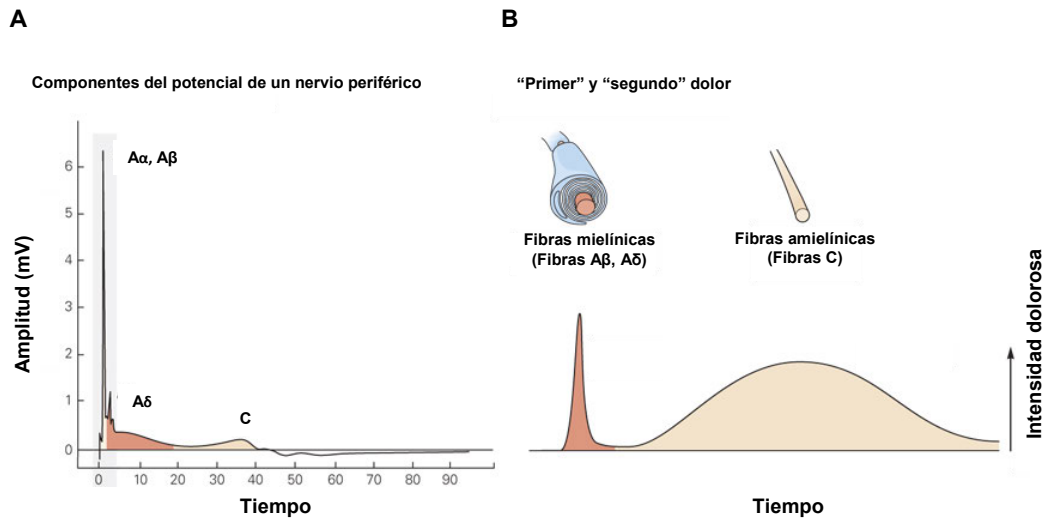


Figura 1.7. Relación entre el tipo de fibra nerviosa y la velocidad de conducción. Los nervios periféricos incluyen fibras aferentes mielinizadas de pequeño diámetro ($A\beta$), medio y grande ($A\alpha$, $A\beta$) y pequeñas no mielinizadas (C). El hecho de que la velocidad de conducción esté relacionada directamente con el diámetro de la fibra se ve reflejado en el registro extracelular de los cambios de potencial en un nervio periférico (A). Así mismo se representa la participación de las fibras $A\beta$ y C en el “primer (rápido) y segundo dolor (lento)” respectivamente (B). Las fibras $A\beta$ participarían en la transmisión nociceptiva en condiciones patológicas. Tomada con modificaciones de Julius y Basbaum, 2011.

Los nociceptores, como las demás neuronas sensitivas primarias, son pseudobipolares en las que un único proceso emana del soma de la célula DRG o del TG y se bifurca en un axón periférico encargado de la inervación somática o visceral y en un axón central que hace sinapsis con las neuronas de segundo orden en el asta dorsal de la médula espinal o el núcleo del TG (Basbaum et al., 2009). De esta manera, la propagación de señales eléctricas entre la periferia y la médula espinal (o tronco cerebral) sigue una vía axonal directa, reduciéndose así el riesgo de fallos en la transmisión (Figura 1.8).

Los axones centrales de las neuronas DRGs nociceptivas terminan en las láminas I, II y V del asta dorsal de la médula espinal (Basbaum et al., 2009). Las fibras $A\beta$ acceden fundamentalmente a las láminas I y V, mientras que las fibras de tipo C lo hacen casi exclusivamente a la lámina II. Por tanto, la lámina II (sustancia gelatinosa de Rolando) recibe únicamente terminaciones de nociceptores con fibras amielínicas (Todd et al., 2006).

Desde un punto de vista neuroquímico las neuronas nociceptivas son también una población heterogénea, por cuanto que emplean el glutamato y diversos neuropéptidos (SP y el péptido relacionado con el gen de la calcitonina; CGRP). Debe señalarse que ambos péptidos no solo se liberan por las terminaciones nerviosas centrales participando en la transmisión sináptica entre las neuronas nociceptivas primarias y secundarias, sino también desde las terminaciones nerviosas periféricas, siendo responsables del fenómeno de la inflamación neurogénica que

contribuye al fenómeno de sensibilización periférica (hiperalgesia) a los estímulos nocivos (véase más adelante). Las fibras C peptidérgicas expresan mayoritariamente los canales TRPV1, mientras que las no peptidérgicas (glutamatérgicas) pueden ser identificados mediante marcaje con isolectina IB4 (Basbaum *et al.*, 2009).

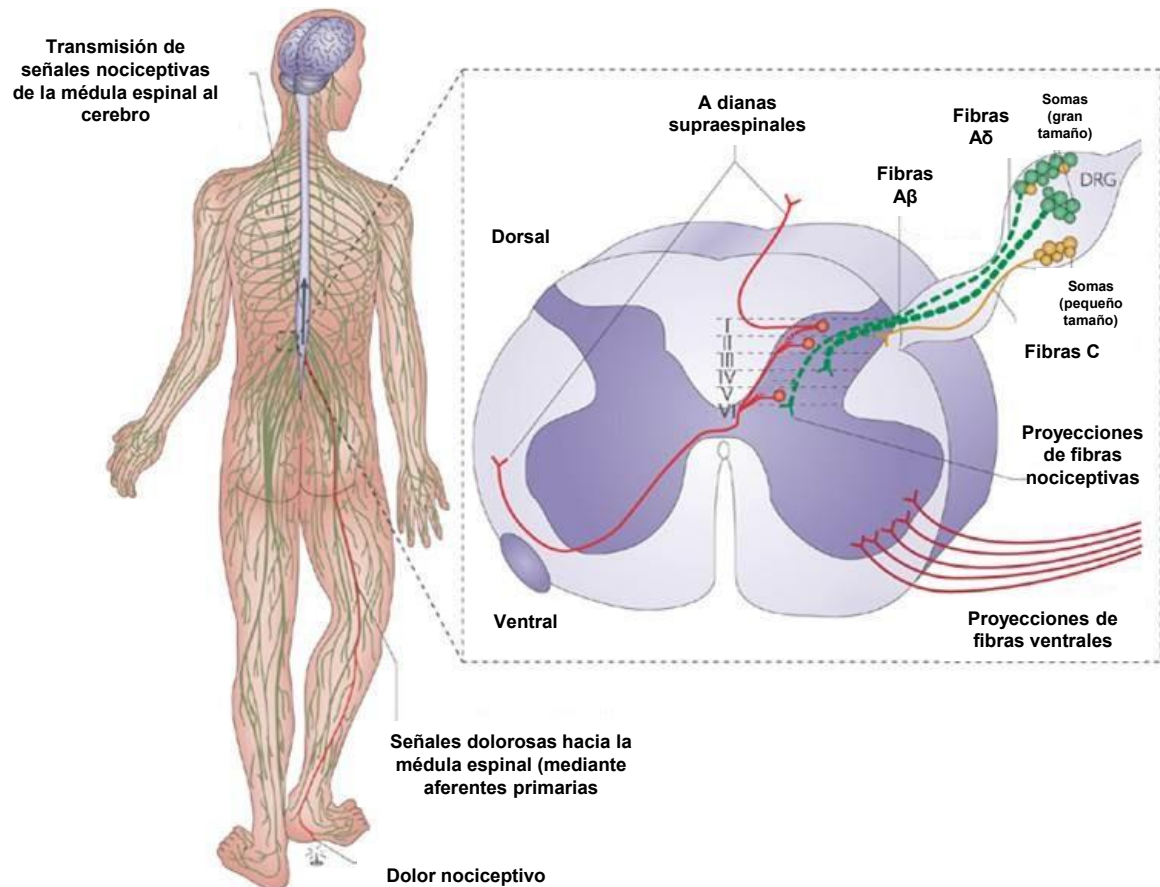


Figura 1.8. La transmisión dolorosa. La señal dolorosa se transmite al asta dorsal de la médula espinal a través de las neuronas nociceptivas primarias. Las fibras de estas neuronas son fundamentalmente mielinizadas de pequeño tamaño ($A\beta$) y amielínicas (fibras C). Las terminaciones hacen sinapsis en las láminas I, II y V de asta dorsal en donde las segundas neuronas generan nuevas señales que son transmitidas hasta el tronco encefálico y el cerebro, donde se percibe la sensación dolorosa. Tomada con modificaciones de Milligan *et al.*, 2009.

La mayor parte de la información nociceptiva se transmite a centros supraespinas por vías cruzadas ascendentes, que constituyen los tractos espinotalámico, espinoreticular o espinobulbar, espinomesencefálico y espinohipotálamico (Meyerson *et al.*, 2006; Todd *et al.*, 2006).

Una vez que las señales térmicas, mecánicas y químicas son detectadas por el terminal aferente primario se activan distintos canales dependientes de voltaje como los de Na^+ (Na_v) y K^+ (K_v) fundamentales para la generación de potenciales de acción que se transmiten hasta el asta dorsal de la médula espinal. A este nivel, los Ca_v juegan un papel clave mediando la liberación

exocitósica del neurotransmisor en la primera sinapsis de la vía nociceptiva (Basbaum *et al.*, 2009). En las neuronas sensitivas se expresan diversos subtipos de canales Na_v , tanto sensibles (Na_v 1.1, 1.6 y 1.7) como resistentes a tetrodotoxina (TTX; Na_v 1.8 y 1.9). Estudios en ratones KO para los canales Na_v 1.7 y Na_v 1.8 sugieren que juegan un papel clave en la hipersensibilidad mecánica y térmica en los procesos inflamatorios, y en las respuestas agudas a los estímulos mecánicos nocivos (Nassar *et al.*, 2004). El canal Na_v 1.7 está presente en el soma, en los axones y en las terminaciones de las neuronas nociceptivas tanto peptidérgicas como no peptidérgicas siendo responsable de una corriente de umbral bajo, con rápida activación e inactivación que dota al canal de la capacidad de generar potenciales de acción en respuesta a pequeñas despolarizaciones. El Na_v 1.8 tiene un umbral de activación más alto que el Na_v 1.7, media una corriente que es lentamente inactivante, lo que favorece la descarga repetitiva de potenciales de acción en respuesta a despolarizaciones sostenidas. El canal Na_v 1.9, que se expresa selectivamente en las neuronas DRG pequeñas, se activa a potenciales cercanos al potencial de membrana en reposo y presenta una cinética lenta por lo que es capaz de producir una corriente de Na^+ persistente que amplifica la respuesta de los nociceptores a estímulos despolarizantes subumbrales (Black *et al.*, 2012; Hajj *et al.*, 2013; Benarroch *et al.*, 2016).

Los Ca_v expresados en los nociceptores son del tipo N, P/Q y T (Basbaum *et al.*, 2009; de Vries *et al.*, 2009; Zamponi *et al.*, 2009). Los canales de tipo N están localizados en las terminaciones nerviosas y desencadenan la liberación de glutamato, SP y CGRP, tanto en las terminaciones centrales como periféricas de los nociceptores (**Figura 1.9**).

Por su parte, los nociceptores expresan diferentes tipos de canales de K^+ . Estos incluyen varios tipos de canales K_v , canales de K^+ con doble poro (K2P), canales de K^+ activados por Ca^{2+} (K_{Ca}), los activados por Na^+ (K_{Na}) y, en menor medida, los rectificadores internos (KCNK). Estos canales median la excitabilidad de los nociceptores regulando el potencial de membrana en reposo, el umbral, la forma y frecuencia de los potenciales de acción así como la liberación del neurotransmisor (Honoré *et al.*, 2007; Benarroch *et al.*, 2016).

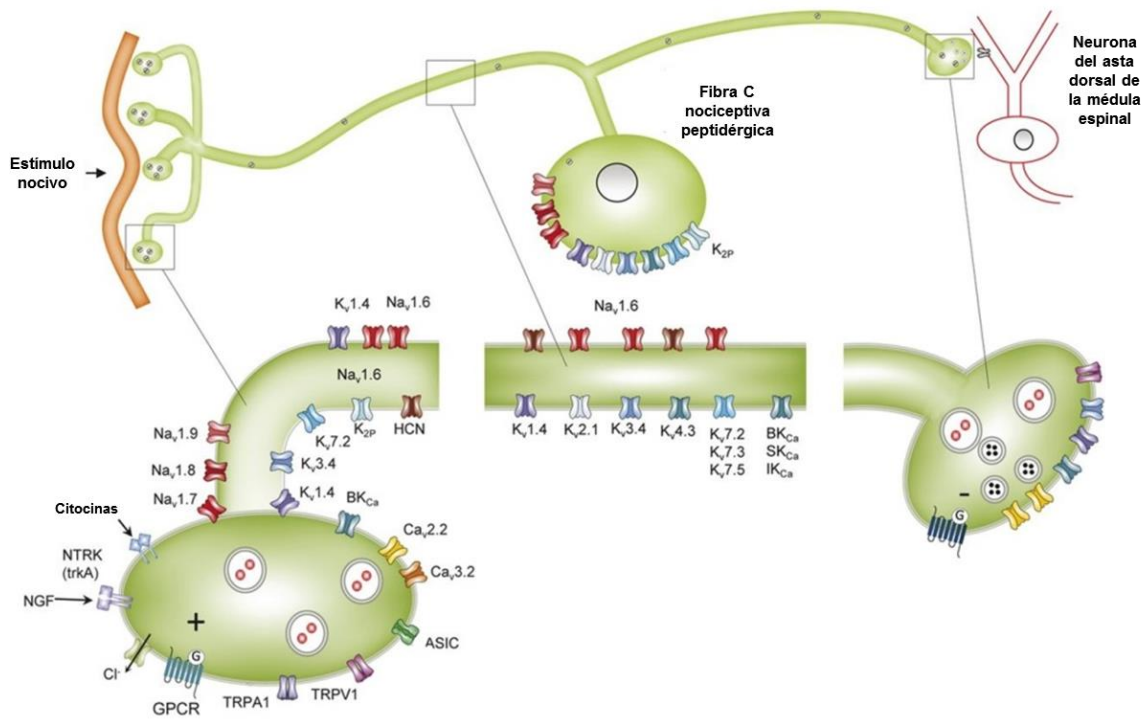


Figura 1.9. Fibras C peptidérgicas. Se representa los distintos canales y receptores que aparecen en las fibras C peptidérgicas. Los nociceptores son altamente heterogéneos conteniendo canales que responden a distintos estímulos (térmicos y químicos; TRPV1 y TRPA1), como a sustancias proinflamatorias liberadas por células gliales (citocinas, NGF, BC, etc.). Los nociceptores también expresan un amplio repertorio de canales Na_v , Ca_v y K_v fundamentales para la generación de los potenciales de acción que se transmiten hasta el asta dorsal de la médula espinal. Tomada con modificaciones de Benarroch *et al.*, 2016.

1.1.5. Modulación

La transmisión nociceptiva se modula a todos los niveles mediante interneuronas y células gliales pertenecientes a circuitos locales, y mediante las vías eferentes descendentes—inhibidora y excitadora—que actúan en las astas dorsales de la médula espinal (Griffin y Clifford, 2012). Estas vías proyectan a la sustancia gris periacueductal (SGP) y posteriormente a la médula rostral ventromedial (MRV), que a su vez envía las señales al asta dorsal de la médula espinal (ADME) ejerciendo una modulación inhibidora o excitadora/facilitadora (Stamford, 1995; Warren *et al.*, 1997; Millan, 1999; Basbaum y Jessell, 2000; Petrovic y Ingvar, 2002). Los principales neurotransmisores inhibidores del asta dorsal son los péptidos opioides, la NA, la 5-HT, la glicina y el GABA (Griffin y Clifford, 2012; Forman *et al.*, 2012) y los excitadores el óxido nítrico (NO) y el ATP.

La vía SGP-MRV está formado por tres tipos de neuronas: células OFF, células ON y células neutrales. Las dos primeras, se activan o inhiben de manera secuencial por impulsos que proviene de la SGP y mandan fibras descendentes que terminan en el ADME (Mason y Fields, 1989).

Tanto las células ON como las OFF proyectan desde la MRV al ADME pero mientras que la activación de las primeras por la llegada de un estímulo nociceptivo ejerce una acción permisiva o facilitadora (pronocicepción), las segundas tienen un papel inhibidor de la transmisión nociceptiva (antinocicepción). Las células neutrales, no estarían aparentemente relacionadas con el dolor agudo, habiéndose propuesto que actuarían como células de reserva que se convertirían en células ON u OFF durante el desarrollo del dolor crónico (*Miki et al., 2012*).

La activación o inhibición de estas células también estaría regulada por la liberación de diversas sustancias procedentes de células extrínsecas, como la NA, o intrínsecas de la MRV como las encefalinas (ENK) que inhiben a las células ON. Las neuronas de la SGP almacenan aminoácidos excitadores (glutamato) que, al liberarse en la MRV, activan las células OFF que ejercerían un efecto inhibidor sobre la transmisión nociceptiva en el ADME. Además, algunas células OFF que contienen 5-HT, activan otras células OFF que a través de sus proyecciones en la propia MRV inhibirían a las células ON. Por otra parte, la gran mayoría de las células ON contienen GABA que actuando sobre las células OFF producen un efecto neto facilitador de la transmisión nociceptiva (*Fields, 1991*).

La NA induce efectos distintos según el tipo de receptor al que se una. Así la unión al receptor $\alpha 1$ adrenérgico incrementa la actividad de las células ON (pronocicepción), mientras que la activación del receptor $\alpha 2$ adrenérgico inhibe las células ON (antinocicepción). El papel de la 5-HT es controvertido, algunos autores postulan que los receptores 5-HT₁, 5-HT₃ y 5HT₇ podrían ser responsables de las acciones facilitadoras a nivel espinal (*Mickle et al., 2012; Chang et al., 2013*) mientras que otros sostienen que su activación participa en la modulación inhibidora de la nocicepción (*Yanarates et al., 2010; Hayashida et al., 2012; Figura 1.10*).

El sistema opioide endógeno (SOE) tiene un papel relevante en la modulación inhibidora en el ADME, tanto a través de las fibras descendentes inhibidoras que desde el MRV proyectan a la médula espinal liberando localmente dinorfina como de los receptores opioides localizados tanto a nivel pre como postináptico (*Tan-No et al., 2009*).

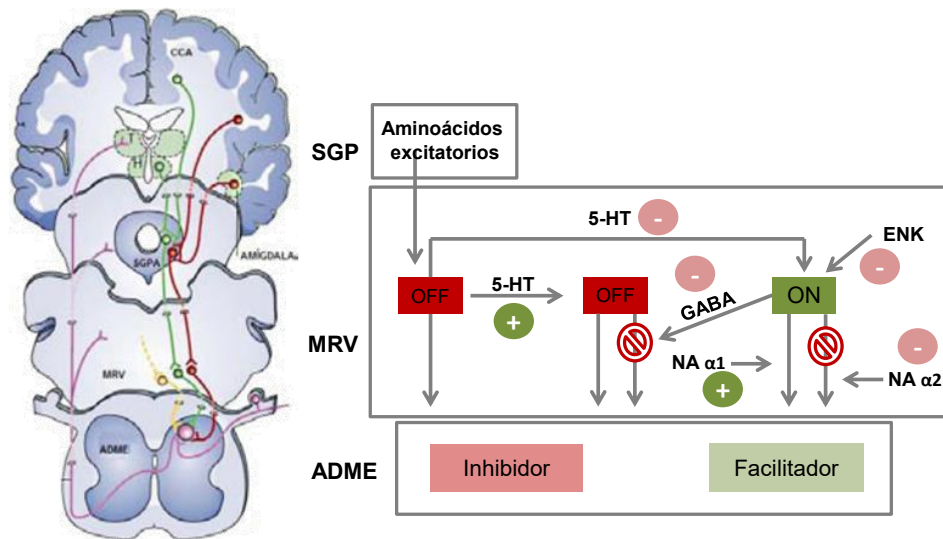


Figura 1.10. La modulación nociceptiva a través de las células ON/OFF. Se representa la modulación dolorosa a través de la vía descendente SGP (sustancia gris periacueductal)-MRV (médula rostral ventromedial)-ADME (asta dorsal médula espinal) por medio de la liberación de mediadores de distinta naturaleza por las células ON/OFF, que provocaran un efecto inhibidor/activador en los somas de las neuronas del asta dorsal de la médula espinal. Véase el texto para una explicación detallada. Tomada con modificaciones de *Fields et al., 2004*.

El NO es un gas que se genera a partir de L-arginina y oxígeno mediante tres isoformas de la óxido nítrico sintasa: neuronal (nNOS), inducible (iNOS) y endotelial (eNOS; *Knowles y Moncada, 1994; Alderton et al., 2001*). Este gas neuromodulador estaría implicado en las vías neurales nociceptivas centrales y periféricas a través de la interacción con la guanilato ciclasa, que es la responsable de la síntesis de GMPc (*Mao, 1999; Calabrese et al., 2007*). La producción de NO por la nNOS en el SNC requiere del incremento de los niveles citosólicos de Ca^{2+} frecuentemente como consecuencia de la activación de receptores NMDA (*Miclescu et al., 2009; Cury et al., 2011*). El NO interviene en el proceso de sensibilización a nivel de la médula espinal bien directamente o a través de la vía NO-GMPc-PKG (*Meller et al., 1993*).

Por otra parte, la activación de receptores purinérgicos por ATP de origen fundamentalmente glial, modifica el gradiente de Cl^- a través de la membrana neuronal de forma que el efecto del GABA mediado por receptores de tipo A pasa a ser de inhibidor/hiperpolarizante a excitador/despolarizante en las neuronas espinales (*Coull et al., 2005*); así mismo, este nucleótido favorecería la transmisión sináptica entre la primera y segunda neuronas nociceptivas al aumentar la inserción de receptores AMPA en la membrana somatodendrítica de la neurona de segundo orden (*Gordon et al., 2005*).

1.1.6. Percepción

Las áreas cerebrales fundamentalmente implicadas en la percepción del dolor son la corteza somatosensorial, encargada de la localización espacial (discriminativa) de la sensación dolorosa, la corteza prefrontal y el sistema límbico. En este último, la amígdala y la corteza cingular anterior

son las áreas especialmente responsables de la dimensión afectiva del dolor (*Fields et al., 2006*).

La principal vía ascendente del sistema nociceptivo es la vía espinotalámica. Se origina a partir de neuronas meduloespinales y comprende dos fascículos: i) ventral y cruzada, formada por fibras de las neuronas con somas en las láminas V y VII que transmiten información sobre tacto grueso y presión; ii) lateral, en el que predominan axones de las neuronas de la lámina I encargadas de transmitir información sobre tacto grueso, dolor y temperatura (*Apkarian et al., 1989*).

El tálamo está constituido por diversos núcleos que se agrupan en dos regiones, medial y lateral con funciones diferenciadas en el procesamiento de la información y conexiones (aferencias y eferencias) con las demás estructuras del sistema nociceptivo (*Albe-Fessard et al., 1985; Jones y Derbyshire, 1996*). La región medial, incluye los núcleos mediales e intralaminares y se relaciona con la SGP del mesencéfalo, la circunvolución del cíngulo y la corteza prefrontal participando en el procesamiento del componente afectivo y emocional del dolor. La región lateral comprende los núcleos ventrales posterolateral y posteromedial, que se proyectan hacia la corteza parietal somatosensorial, siendo el responsable de la localización exacta del estímulo doloroso (*Sherman et al., 1997*).

1.1.7. Fisiopatología del dolor crónico

Como ya se ha mencionado, el dolor tiene una función protectora ya que nos advierte del daño tisular real o inminente generando respuestas reflejas de evitación y comportamientos más elaborados para minimizar el daño. Sin embargo, cuando el dolor persiste como consecuencia de un estímulo prolongado o de alta intensidad pierde su sentido biológico dando lugar a trastornos orgánicos y psicológicos. El dolor crónico se asocia a modificaciones de los distintos procesos o fases del dolor apareciendo el fenómeno de sensibilización, tanto central como periférico, que provoca una disminución de los umbrales nociceptivos traduciéndose en dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia.

La sensibilización periférica del nociceptor se produce cuando un estímulo activa un reflejo axónico por el que los potenciales de acción generados en el nociceptor provocan la liberación por las terminaciones periféricas cercanas al área estimulada de neuropéptidos como la SP y CGRP. Estas sustancias son responsables de iniciar una respuesta inflamatoria caracterizada por la triada de Lewis (rubor, dolor y tumor) y dependiente de procesos tan diversos como la vasodilatación, la extravasación de plasma, la desgranulación de los mastocitos, la activación de macrófagos residentes en el tejido con la consiguiente liberación de quimiocinas y citocinas, además de la estimulación adicional de las fibras nociceptivas.

El proceso se inicia a partir de un estímulo nocivo que no sólo origina una señal nociceptiva sino también una respuesta inflamatoria local que conlleva la activación de mastocitos

y macrófagos residentes en el tejido y células de Schwann, con la consiguiente liberación de mediadores proinflamatorios y el reclutamiento de nuevas células del sistema inmune (*Basbaum et al., 2008; Ellis y Bennett, 2013*). Las células de Schwann se desdiferencian al tiempo que comienzan el proceso de degradación de la vaina de mielina en el lugar de la lesión, las células del sistema inmune (neutrófilos, linfocitos, etc.) y también del sistema nervioso sintetizan y liberan los componentes de la denominada sopa inflamatoria como la BC, PGs, ATP, NGF, citocinas (TNF- α , IL-1 β e interleucina-6 (IL-6) y quimiocinas proinflamatorias (CC-quimiocina ligando 2 (CCL2), CXC-quimiocina ligando 1 (CXCL1), CX5-quimiocina ligando 5 (CXCL5) y fractalquina). Es de destacar que las neuronas nociceptoras expresan receptores de la práctica totalidad de estos mediadores. Estos receptores incluyen receptores acoplados a proteínas G (GPCR; *G protein-coupled receptors*), receptores ionotrópicos y receptores de tirosina cinasa, y su activación da como resultado la generación de segundos mensajeros como Ca^{2+} y AMPc, que a su vez activan proteínas cinasas como la A (PKA), la PKC, la proteína cinasa dependiente de calcio/calmodulina (CaMK; *Ca²⁺ calmodulin-dependent protein kinase*), la fosfoinositido 3-cinasa (PI3K) y las activadas por mitógenos (MAPKs; *Mitogen-activated protein kinases*) o la regulada por señales extracelulares (ERK; *extracellular signal-regulated kinases*), la p38 MAPK y la JUN N-terminal cinasa (JNK; *c-Jun N-terminal kinase*). La activación de estos receptores y de sus cascadas de señalización provoca hiperexcitabilidad de las neuronas nociceptivas que conduce a la disminución del umbral de activación frente a estímulos mecánicos, térmicos y químicos, con el consiguiente aumento de la frecuencia de disparo y la expansión del campo receptivo debido a la activación de los receptores silentes (hiperalgesia secundaria; *Habler et al., 1992; Schmidt et al., 2000; Rong et al., 2014; Figura 1.11*).

El NGF es un factor que promueve la supervivencia y desarrollo de las neuronas sensitivas durante la embriogénesis y también en la vida adulta cuando se produce una lesión tisular (*Ritner et al., 2009*). Entre sus muchas dianas celulares, el NGF actúa directamente sobre las fibra C peptidérgicas mediante la unión a un receptor acoplado a tirosina cinasa A (TrkA), lo que se traduce en hipersensibilidad al calor y a los estímulos mecánicos a través de mecanismos temporalmente distintos. En un principio, la interacción NGF-TrkA activa una cascada de señalización que implica a enzimas como la PLC, MAPK y PI3K aumentando la actividad, generalmente vía fosforilación, de proteínas con función transductora de los estímulos dolorosos como el canal TRPV1 (*Chuang et al., 2001*). Además de estas acciones rápidas, el NGF también se transporta retrógradamente al núcleo del nociceptor donde promueve una mayor expresión de proteínas muy diversas implicadas en la señalización nociceptiva como la SP, los canales TRPV1 y los canales $\text{Na}_v 1.8$ (*Ji et al., 2002; Chao, 2006; Ritner et al., 2009; Basbaum et al., 2009*).

Un mecanismo recientemente descrito de sensibilización periférica y que actuaría en una escala de tiempo intermedia entre las dos que se acaban de mencionar sería la sobreexpresión del canal TRPV1 en la membrana del nociceptor dependiente de la exocitosis de vesículas que almacenan CGRP y lo portan en su membrana. Este proceso se activaría por el aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} que se vería facilitada por agentes como la BC y el ATP, con un bien conocido efecto sensibilizante (Devesa *et al.*, 2014).

La sensibilización central es el resultado de la llegada de información nociceptiva a la médula espinal. Esta circunstancia determina un aumento de la eficacia (potenciación) de la transmisión sináptica entre la primera y segunda neurona de la vía nociceptiva, en cuyo desarrollo participaría tanto el elemento presináptico como el postsináptico. Entre las modificaciones a nivel presináptico cabe mencionar el aumento en la liberación de neurotransmisor (glutamato y péptidos) dependiente tanto del incremento de la frecuencia de los potenciales de acción (Obata *et al.*, 2003) relacionado con la disminución de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje en el soma de las neuronas DRG (Hendrich *et al.*, 2008) como del incremento de la expresión en las terminaciones nerviosas centrales de canales activados por ligando (P2X3, TRPV1) facilitadores de la exocitosis de neurotransmisores. A nivel postsináptico, cabe mencionar el aumento de actividad y número de receptores de glutamato (NMDA, AMPA y metabotrópicos; Ultenius *et al.*, 2006) que contribuirían dependientes del aumento de Ca^{2+} citosólico (Basbarum *et al.*, 2008; **Figura 1.12**).

Como ya se ha indicado, las consecuencias sensitivas derivadas de la sensibilización son el dolor espontáneo, la alodinia y la hiperalgesia. La alodinia consiste en la aparición de dolor en respuesta a una estimulación habitualmente inocua, mientras que la hiperalgesia se define como un dolor de una intensidad mayor de la esperada en relación con la intensidad del estímulo nocivo aplicado (**Figura 1.13**). Ésta puede ser primaria, si la desencadenó una sensibilización periférica, o secundaria, si depende de cambios a nivel central.

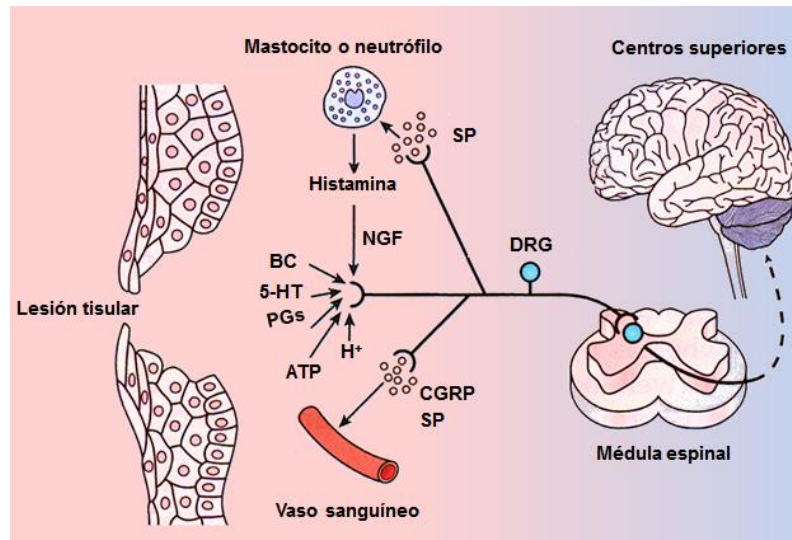


Figura 1.11. Sensibilización periférica. Los agentes sensibilizantes, tanto de origen nervioso como liberados por células del sistema inmune o por las células residentes lesionadas, favorecen la transducción de señales por los nociceptores. La exposición continua a estos mediadores origina cambios en la expresión de proteínas de las neuronas DRG que se traducen en una mayor excitabilidad celular y en última instancia en la sensibilización central y periférica. BC: bradicinina, PGs: prostaglandinas, 5-HT: serotonina, NGF: factor de crecimiento nervioso, SP: sustancia P, CGRP: péptido relacionado con el gen de la calcitonina, DRG: ganglio espinal. Tomada con modificaciones de Julius y Basbaum, 2011.

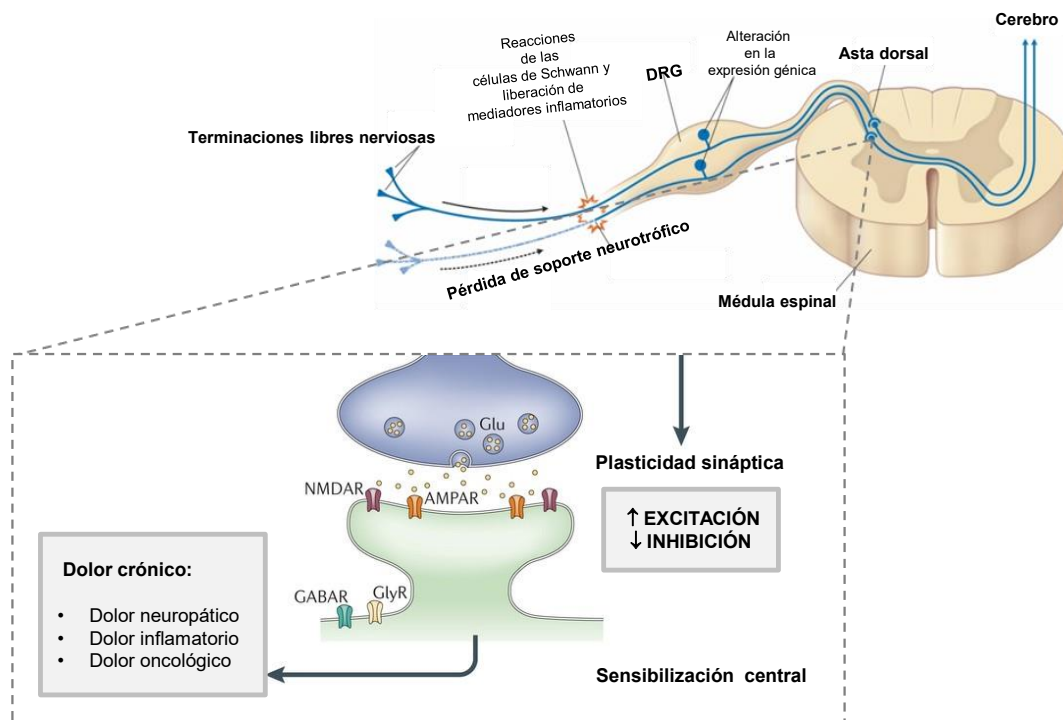


Figura 1.12. Sensibilización central. La lesión tisular o nerviosa determina la activación intensa de la transmisión nociceptiva en la médula espinal central, lo que conduce a la acumulación de Ca^{2+} en el citosol de los elementos postsinápticos con la consiguiente activación de proteínas cinasas que vía reacciones de fosforilación controlan la actividad de receptores y canales iónicos así como sus niveles de expresión en la membrana celular. Tomada con modificaciones de Rong-Ji et al., 2014.

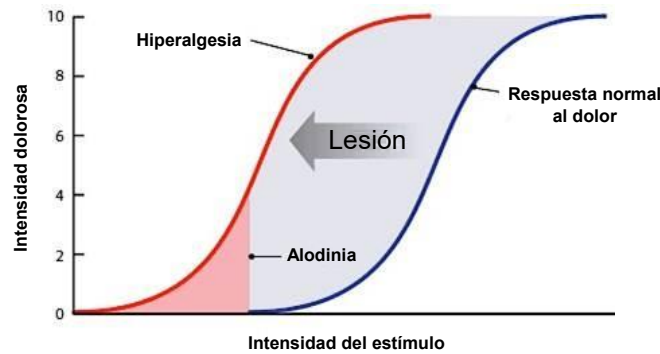


Figura 1.13. Curva intensidad del estímulo-respuesta dolorosa. La línea azul representa la respuesta característica del dolor agudo nociceptivo mientras que la línea roja muestra el desplazamiento hacia la izquierda de la respuesta en el caso del dolor crónico (neuropático o nociceptivo) con aparición de alodinia e hiperálgia. Tomada con modificaciones de *Jensen et al., 2014*.

Si bien los mecanismos fisiopatológicos que acabamos de describir son en líneas generales comunes a todos los procesos de cronificación del dolor, el dolor crónico resultante de neuropatías periféricas presenta a la luz de los resultados obtenidos en modelos experimentales una serie de modificaciones a nivel molecular, celular y tisular que a continuación referimos (**Figura 1.14**):

- Cambios moleculares:

i) cambios en el patrón de expresión de los canales Na_v en los nervios periféricos. Como ya se ha mencionado, las neuronas sensitivas expresan una importante variedad de canales Na_v : Na_v 1.3, Na_v 1.6, Na_v 1.7, Na_v 1.8 y Na_v 1.9. Estos canales se diferencian tanto por sus propiedades farmacológicas (los canales Na_v 1.1, Na_v 1.6, Na_v 1.7 serían sensibles a TTX mientras que los Na_v 1.8 y Na_v 1.9 serían resistentes) como biofísicas (dependencia de voltaje, cinética de inactivación y de reactivación). En los últimos años, la contribución del canal Na_v 1.7 en la transmisión de la señal dolorosa ha recibido gran atención debido a su expresión selectiva en las neuronas nociceptivas (*Nassar et al., 2005; Cox et al., 2006; Dib-Hajj et al., 2008*). Mutaciones en el gen que codifica este canal y suponen la pérdida de funcionalidad del mismo provocando la incapacidad para detectar estímulos nocivos, en contraste con las mutaciones que originan ganancia de función que se asocian a hiperexcitabilidad de la neurona nociceptiva primaria dando lugar a trastornos como la eritromelalgia y/o el dolor extremo paroxístico (*Yang et al., 2004; Basbaum et al., 2009*). El canal de sodio Na_v 1.8 también se encuentra altamente expresado en la mayoría de las fibras C. La contribución de este canal se ha estudiado a través de ratones KO en los que su ausencia ha mostrado deficiencias modestas en la sensibilidad al calor nocivo y a la presión inofensiva; sin embargo, el canal Na_v 1.8 resulta necesario para la percepción del frío, ya que los ratones que carecen de este canal son insensibles a este tipo de estímulo en una amplia gama de temperaturas (*Zimmermann et al., 2007; Basbaum et al., 2009*). Ello se debe a que el canal Na_v 1.8 es el único entre los Na_v que no se inactiva a bajas temperaturas. La regulación al alza (*up-regulation*) de la

expresión de los canales Na_v 1.8 se ha relacionado con el dolor neuropático y se traduce en la aparición de descargas ectópicas de potenciales de acción y la aparición de dolor espontáneo. Diversos estudios realizados en ratones KO para el canal de Na_v 1.3 han descrito para la aparición de dolor neuropático, su relación con la administración del factor neurotrófico derivado de la glía que invierte el comportamiento del dolor neuropático y normaliza la expresión del canal.

ii) Entre dichos cambios se encuentra la disminución de la expresión de la subunidad $\alpha 1$ de los canales Ca_v de tipo N en el soma de las neuronas DRG en animales sometidos a axotomía ciática o constricción crónica del nervio ciático que provocan la disminución de la corriente de Ca^{2+} , lo que favorece la descarga espontánea de potenciales de acción (Kim *et al.*, 2001). Así mismo, se ha descrito el aumento de la expresión de la subunidad $\alpha 2\beta$ -1 de los canales Ca_v en las terminaciones centrales de las neuronas DRG de pequeño tamaño, lo que podría explicar en parte el beneficio de fármacos como la gabapentina o la pregabalina (que se unen a $\alpha 2\beta$ -1) en el tratamiento del dolor neuropático (Davies *et al.*, 2007; Basbarum *et al.*, 2008; Boroujerdi *et al.*, 2011). Además los canales Ca_v de tipo T y R aumentan su expresión en las fibras C en modelos animales de neuropatía diabética o tras una lesión nerviosa directa.

iii) Aumento de la expresión y actividad de canales iónicos multimodales como el TRPA1 dependiente de NGF.

iv) Por otra parte, existe una pérdida de función y de número de interneuronas inhibitoras de la médula espinal (desinhibición) que daría lugar a un aumento de la transmisión del dolor (Melzack y Wall, 1965; Basbaum *et al.*, 2008).

- Cambios celulares:

Se producen en el contexto de la neuroinflamación y serían en parte consecuencia de los cambios moleculares ya mencionados. Consisten en la descarga espontánea de potenciales en áreas distintas de los nociceptores, aumento de la excitabilidad eléctrica y cambios en la morfología de los somas neuronales y en el número de las fibras nerviosas. Las lesiones en los nervios periféricos también favorecen la reorganización de las conexiones sinápticas en el asta dorsal de la médula espinal. Al ser las fibras C las que mayoritariamente se pierden tras la lesión neural, las terminaciones nerviosas de las fibras $\text{A}\beta$ tienen libertad para invadir regiones de las astas dorsales que habitualmente ocupan las terminaciones de las fibras C. Otro cambio estructural sería secundario a la muerte celular por excitotoxicidad, relacionada con la liberación de glutamato por las terminaciones nerviosas centrales de las neuronas nociceptivas primarias y que afectaría de forma predominante a las interneuronas inhibitoras localizadas en la lámina II (Willis *et al.*, 1991). Como ya se ha señalado, la lesión nerviosa periférica va a producir un incremento en la excitabilidad de las neuronas del asta dorsal debido a la constante entrada de estímulos. Las fibras

C son las que fundamentalmente van a sostener y mantener esta hiperexcitabilidad contribuyendo a fenómenos como el *wind-up* caracterizado por un incremento de la amplitud de los potenciales sinápticos en respuesta a la llegada continua de estímulos (Davies y Lodge, 1987; Liu y Sandkühler, 1995). En este fenómeno se ve implicada la liberación de SP, glutamato y NO por parte de las fibras C patológicamente sensibilizadas (ver epígrafe sobre modulación del dolor); sin embargo, el papel del NO es controvertido. La inhibición de la síntesis de NO tiene un efecto antinociceptivo cuando el dolor se genera de nociceptores pero exacerba el dolor en modelos de hiperalgesia mecánica (Moore et al., 1991; Kitto et al., 1992; Malmberg y Yaksh, 1993; Esplugues, 2002). Este último efecto sugiere que el NO facilita los mecanismos de inhibición descendente sobre las neuronas del asta dorsal, mediante la potenciación de la liberación de glicina y GABA por las interneuronas inhibitorias (Watkins et al., 1999; Millan et al., 2002; Cury et al., 2011). Además, varias líneas de investigación han sugerido el vínculo entre la activación de la vía NO-GMPc y la apertura de los canales K⁺ sensibles a ATP, lo que restauraría el umbral de descarga del nociceptor (Segawa et al., 2001; Han et al., 2001; 2002).

- Cambios tisulares:

i) A este respecto, debe destacarse la participación del sistema nervioso simpático (SNS) en algunas formas de dolor neuropático, en razón a una mayor expresión de receptores adrenérgicos $\alpha 1$, $\alpha 2$ y $\beta 2$ en las terminaciones y somas de las neuronas nociceptivas primarias, lo que posibilita una mayor sensibilidad a las catecolaminas (CAs), tanto circulantes (adrenalina, A, fundamentalmente) como localmente liberadas (A) por las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas postganglionares. Por ello, los estímulos de muy diversa índole que desencadenan respuestas simpáticas pueden acentuar o incluso desencadenar un dolor intenso, que en la clínica recibe el nombre de dolor simpático, término que ha sido sustituido por “mantenido por el SNS” (SMP, *Sympathetically Maintained Pain*; Hoffman y Williams, 2012).

ii) Estudios en modelos animales sometidos a axotomía parcial o completa a la constricción crónica del nervio ciático han demostrado un incremento de la ramificación (*sprouting*) de fibras simpáticas noradrenérgicas en el mismo lado de la lesión. Este fenómeno se detecta en la primera semana tras la lesión y podría ser consecuencia del aumento dramático de los niveles de NGF (Jänig et al., 1996; Lee et al., 1998; Chien et al., 2005; Khan y Smith, 2015; ver epígrafe sobre sistema nervioso simpático y dolor).

iii) Cambios en la actividad del *locus coeruleus* (LC). La mayoría de los datos disponibles en roedores, sugiere que las neuronas de LC no participan en el mantenimiento del umbral basal del dolor. Sin embargo, cuando se cronifica el dolor asociado a una lesión nerviosa, el efecto analgésico de la estimulación eléctrica del LC ipsilateral se reduce o desaparece (Jasmin et al., 2003 y Hayashida et al., 2012; Brightwell y Taylor, 2009).

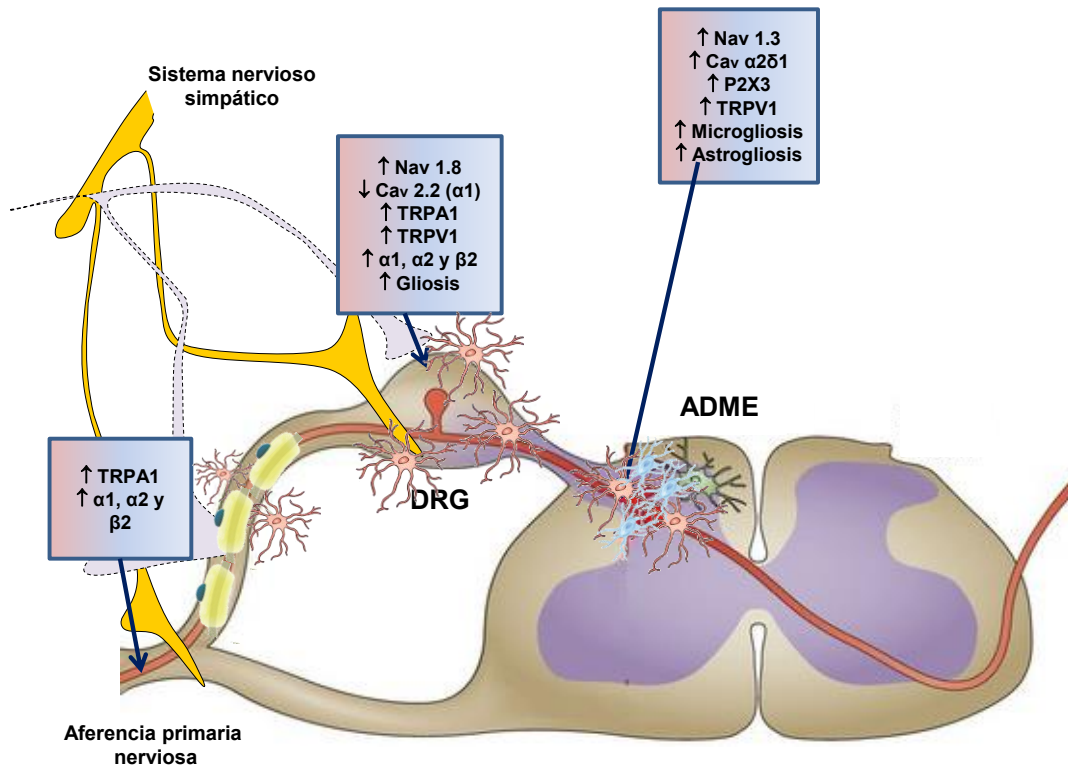


Figura 1.14. Modificaciones moleculares, celulares y tisulares en el dolor crónico neuropático secundario a la lesión de un nervio periférico. Se representan los cambios a nivel periférico a nivel molecular (cambios en los patrones de expresión de canales y receptores), celular (activación y reclutamiento de células gliales: células de Schwann en amarillo; astrocitos en rojo y microglía en azul). Los cambios tisulares están relacionados con el *sprouting* de fibras simpáticas noradrenérgicas. Tomada con modificaciones de *Basbaum et al., 2008*.

1.1.8. Modelos animales para el estudio del dolor neuropático

Dada la complejidad y diversidad de situaciones relacionadas con el dolor neuropático, la utilización de modelos animales es crítica en la investigación al posibilitar una mejor comprensión de los mecanismos subyacentes así como la evaluación de nuevas estrategias farmacológicas para su prevención y tratamiento. Existen diferentes aproximaciones experimentales para el estudio del dolor neuropático que tienen en cuenta la localización (central o periférica) de la lesión nerviosa así como la sintomatología (alodinia y/o hiperalgesia mecánica, térmica, etc.) que se pretende reproducir (*Wall et al., 1979; Djouhri et al., 2006*).

Entre los modelos de dolor neuropático periférico en roedores deben destacarse los que comportan la lesión (constricción, ligadura parcial, axotomías o incluso aplastamiento) de nervios periféricos. Es frecuente, por otra parte, aplicar estas lesiones al nervio ciático ya que tiene una organización común en muchos mamíferos (hombre, primates, gato o rata). En el hombre, el nervio ciático se origina a partir de los niveles espinales L4-S3 (*Gray, 1918*), mientras que en la rata se origina en los segmentos L4-L7 (*Brunner et al., 1980; Swett et al., 1986*). En todos los mamíferos mencionados, sus principales ramas son los nervios tibial, peroneo y sural.

Wall y colaboradores (1979) desarrollaron el modelo consistente en la sección completa del nervio ciático que mimetiza lo que en la clínica humana se llama “miembro fantasma” y que ocurre tras la amputación de miembros o tras la sección transversal de la médula espinal. La axotomía conlleva la interrupción de las aferencias y eferencias inmediata e irreversible con formación de un neuroma. Este modelo se asocia a la aparición frecuente de episodios de autotomía (autoamputación de miembros), lo que constituye un importante inconveniente. *Decosterd y Woolf (2000)* desarrollaron por primera vez en ratas el modelo de lesión nerviosa incompleta (SNI; *spared nerve injury*) seccionando dos de las tres ramas terminales del nervio ciático, lo que produce alodinia mecánica y al frío, así como hiperalgesia mecánica.

Kim y Chung (1992) recurrieron a la ligadura de los nervios espinales proximalmente a los ganglios sensitivos (L5 o L5 y L6). Este modelo se asocia a hiperalgesia y alodinia mecánica que se instauran a los 7 días de la cirugía y se mantienen a lo largo de varias semanas (10-16 semanas). Los individuos sometidos a esta operación presentan alteraciones posturales con una clara tendencia a evitar apoyarse sobre la extremidad operada.

El modelo de *Seltzer (1998)* consiste en la ligadura de un tercio de las fibras del nervio ciático (PSL; *partial sciatic nerve ligation*); los animales sometidos a PSL desarrollan un comportamiento táctil-nocifensivo (lamido) debido al denervamiento parcial que sugeriría un signo de dolor espontáneo, alodinia e hiperalgesia mecánica y térmica.

El dolor neuropático puede además ser el resultado de la compresión e inflamación de los nervios periféricos (*Boyce-Rustay y Jarvis, 2009*). La constricción crónica (*chronic constriction injury*; CCI) del nervio ciático da lugar a modificaciones en la sensibilidad nociceptiva que se instauran a los 7 días de la intervención quirúrgica y se mantienen estables durante un mínimo de 3 semanas. La existencia de un amplio periodo de tiempo permite la valoración de fármacos con un potencial efecto analgésico y la mínima concurrencia de alteraciones motoras, lo han convertido en un modelo profusamente utilizado en estudios sobre el dolor neuropático, pudiéndose valorar alteraciones características de la nocicepción como la hiperalgesia y alodinia mecánicas y al frío (*Bennett and Xie, 1988*; **Figura 1.15; Tabla 1.1**).

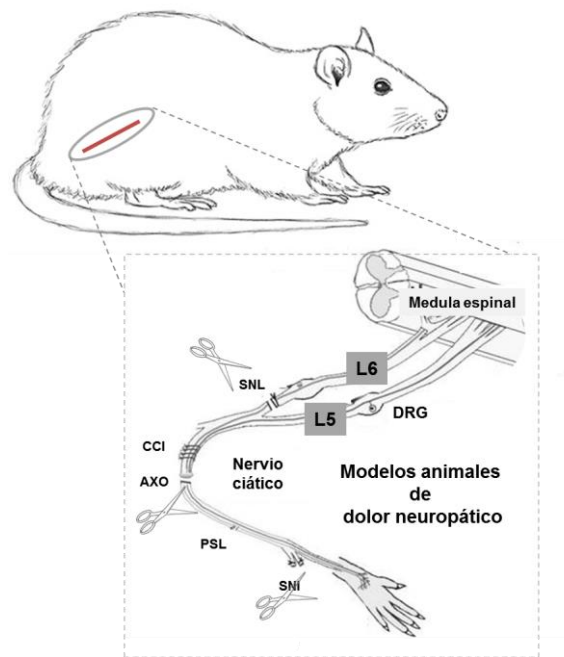


Figura 1.15. Modelos animales de dolor neuropático. Se representa de forma esquemática los modelos más utilizados en el estudio del dolor neuropático. Las abreviaciones, corresponden a los distintos tipos y localizaciones de la lesión nerviosa periférica. SNL (*spinal nerve ligation* o modelo de Chung); CCI (*chronic constriction injury* o modelo de Bennet-Xie); AXO (*axotomy-autotomy*); PSL (*partial sciatic nerve ligation* o modelo de Seltzer); SNI (*spared nerve injury*). Tomada con modificaciones de Lintao y Chao, 2011.

Tabla 1.1. Modelos animales para el estudio del dolor crónico. Se representa de forma esquemática los modelos animales para el estudio de las diferentes modalidades sensitivas características del dolor neuropático. HA: hiperalgesia. Tomada con modificaciones de Lintao y Chao, 2011.

Modelo experimental	Lesión nerviosa	Valoración comportamental
1. Modelo de autotomía (AXO)	Sección total del nervio ciático	Automutilación de la pata operada
2. Ligadura parcial del nervio ciático (PSL)	Ligadura de 1/3 del nervio ciático	<ul style="list-style-type: none"> HA mecánica y térmica (calor) Alodinia mecánica y térmica (frío)
3. Constricción crónica del nervio ciático (CCI)	Compresión del nervio ciático mediante 4 ligaduras	<ul style="list-style-type: none"> HA mecánica y térmica (calor) Alodinia mecánica y térmica (frío)
4. Ligadura del nervio espinal	Ligadura de los nervios L5 o L5 y L6	<ul style="list-style-type: none"> HA mecánica Alodinia mecánica y térmica (frío y calor)

No obstante, también existen otros tipos de modelos de dolor neuropático que no requieren una técnica quirúrgica compleja, si bien producen una afectación sensitiva generalizadas. Algunos ejemplos son los relacionados con la administración de estreptozotocina (neuropatía diabética; *Mansford y Opie, 1968*) y de fármacos antitumorales como los inhibidores de la formación del huso mitótico (*Micó y Ortega, 2006; Boyce-Rustay et al., 2010*). Además, merece la pena mencionar la existencia de modelos de dolor canceroso generados por la inyección de diferentes tipos de células tumorales en la tibia de roedores de laboratorio (*Medhurst et al., 2002*).

1.1.9. Tratamiento del dolor

El dolor es el principal motivo de consulta en medicina humana. Puede constituir un síntoma de una enfermedad que necesita un tratamiento específico o, por el contrario, puede tener entidad nosológica propia, constituyendo en sí la enfermedad a tratar, como sería el caso del dolor neuropático. Este último suele ser refractario a las terapias analgésicas convencionales y por lo tanto, representa una importante necesidad clínica. Comúnmente, este tipo de dolor tiene carácter crónico asociándose a depresión, ansiedad y trastornos del sueño.

En el año 1986 la Organización Mundial de la Salud (OMS) propuso una escalera farmacológica para el tratamiento del dolor, en la que conforme se suben sus peldaños se incorporan fármacos con techo (eficacia) analgésico creciente. La escalera cuenta con tres peldaños, siendo el primero el que aborda el tratamiento del dolor leve con fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE). El segundo peldaño se refiere al tratamiento del dolor moderado a severo, e incorpora al mismo opioides débiles, como la codeína o el tramadol, que se emplearían solos o asociados a AINE. Por último, los enfermos con dolor severo necesitan tratamiento con opioides más eficaces como la morfina, el fentanilo o la oxycodona de liberación retardada, que pueden emplearse solos o en combinación con muy diversos compuestos entre los que cabe mencionar antidepresivos tricíclicos, antiepilépticos o los anestésicos locales (**Figura 1.16**). Esto últimos fármacos aunque pueden tener la consideración de adyuvantes en el tratamiento de cuadros dolorosos de elevada intensidad como los que pueden observarse en enfermos oncológicos, constituyen medicamentos de primera elección en el tratamiento del dolor neuropático (*Wallenstein y Portenoy, 2002*).

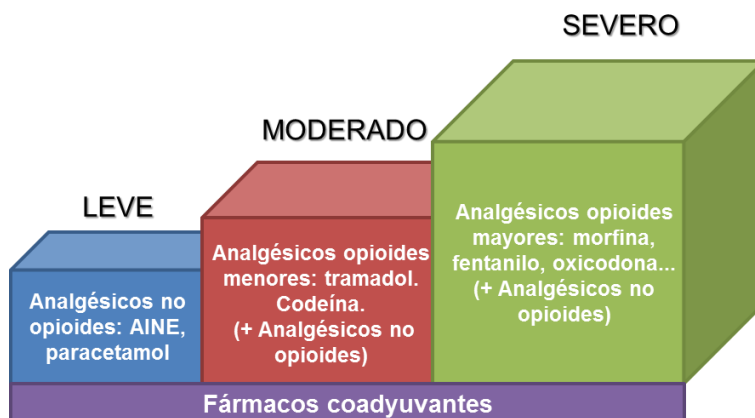


Figura 1.16. Escalera analgésica de la OMS. Se muestra el tratamiento escalonado en función de la intensidad del dolor se propone la utilización de fármacos con eficacia analgésica que pueden emplearse solos o combinados entre sí y/o con fármacos adyuvantes (antidepresivos, antiepilépticos, corticoides, etc.). Tomada con modificaciones de *Organización Mundial de la Salud, 1996*.

1.1.9.1. AINE

Los AINE son un grupo tremendamente heterogéneo y rico de compuestos muy utilizados en la clínica debido a la favorable relación coste-eficacia que presentan. Ejercen 3 efectos farmacológicos bien diferenciados: anti-inflamatorio, analgésico y antipirético, relacionados con un mecanismo de acción común: la inhibición de las ciclooxigenasas (COX).

Las COX son las enzimas responsables de la transformación del ácido araquidónico en PGs, prostaciclina y tromboxanos. Se conocen tres isoformas de COX con funciones y lugar de expresión diferentes. La COX 1 está presente de forma constitutiva en todos los tejidos y participa en el mantenimiento de la homeostasis tisular (*Hemler y Lands, 1976; Berde y Sundel, 1998*). Las PGs producto de la acción de la COX 1 actúan como protectoras gástricas y participan en el inicio de la agregación plaquetaria (*Hawkey, 2002*). La inhibición de esta isoforma da cuenta de los principales efectos adversos de los AINE. La COX 2 presenta una analogía estructural del 60 % con la COX 1, de la que se diferencia en la forma en que se regula su expresión y actividad enzimática. Se expresa constitutivamente en el cerebro (*Vanegas y Shaible, 2001*) y en la médula espinal (*Beiche et al., 1998*), si bien todo daño tisular que comporte una respuesta inflamatoria implica la sobreexpresión de esta isoforma y el incremento de la síntesis de PGs (*Tonai, 1999; Schwab et al., 2002*). Por consiguiente, las PGs producto de la acción de la COX 2 se encuentran involucradas en procesos como la fiebre, el dolor y la inflamación (*Ayoub et al., 2004*). La COX 3 es una isoforma de más reciente descubrimiento (*Chandrasekharan et al., 2002; Oksuz et al., 2016*), cuyas funciones no están completamente aclaradas, aunque podría participar también en la síntesis de los prostanoides relacionados con la fiebre y el dolor (*Willoughby et al., 2000; Schwab et al., 2003*).

Los AINE siguen siendo los analgésicos de primera elección con eficacia en el tratamiento del dolor inflamatorio tanto agudo como crónico, pero no en el dolor agudo (Ayoub *et al.*, 2004).

1.1.9.2. Opioides

Clásicamente se consideraba que los receptores opioides eran tres: μ , OP3 o MOR; β , OP1 o DOR; κ , OP2 o KOR. Con posterioridad, se identificó un cuarto tipo de receptor opioide inicialmente llamado “huérfano” y ahora conocido como receptor de nociceptina/orfanina (N/OFQ, OP4, NOR, ORL1), en razón a su ligando endógeno (Hughes *et al.*, 1975). En la actualidad se conocen tres moléculas precursoras que dan lugar a tres familias de péptidos opioides: la propiomelanocortina que da origen a la β -endorfina, que presentan una elevada afinidad por los receptores opioides μ (Akil *et al.*, 1998); la proencefalina A cuyos principales derivados son la met- y leuencefalina, que activan preferentemente los receptores β (Comb *et al.*, 1982; Akil *et al.*, 1998); y la proencefalina B o prodinorfina de la que derivan las dinorfinas y neoendorfinas con mayor afinidad por los receptores κ (Kakidani *et al.*, 1982; Akil *et al.*, 1998).

Los receptores opioides están acoplados a proteínas G del tipo Gi/Go capaces de inhibir la actividad de la AC y por ello reducir la concentración de AMPc. Su activación origina también el cierre de canales de Ca_v de localización presináptica, lo que se traduce en una reducción de la liberación de neurotransmisores y, la apertura de canales K^+ con rectificación interna de la membrana postsináptica con la consiguiente disminución de la excitabilidad celular (Law *et al.*, 2000). Adicionalmente, la activación de receptores opioides conduce a la activación de proteínas cinasas tipo MAPK, que inician cascadas de señalización que vía activación de la fosfolipasa A2 intervienen en el metabolismo del ácido araquidónico y que también pueden regular la expresión génica (**Figura 1.17**). Los receptores opioides están ampliamente distribuidos por todo SNP y SNC, lo que hace que la administración de fármacos opioides no solo produzca analgesia sino una amplia serie de efectos colaterales (adicción, estreñimiento, depresión respiratorio, etc.). Debe señalarse también la capacidad de estos compuestos para producir hiperalgesia, que no sería un síndrome de rebote resultante de la retirada del tratamiento sino consecuencia de la activación de receptores de tipo Toll (TLRs; *Toll like receptors*) de las células gliales, que desencadena una respuesta neuroinflamatoria a nivel de la médula espinal (Jones *et al.*, 2016).

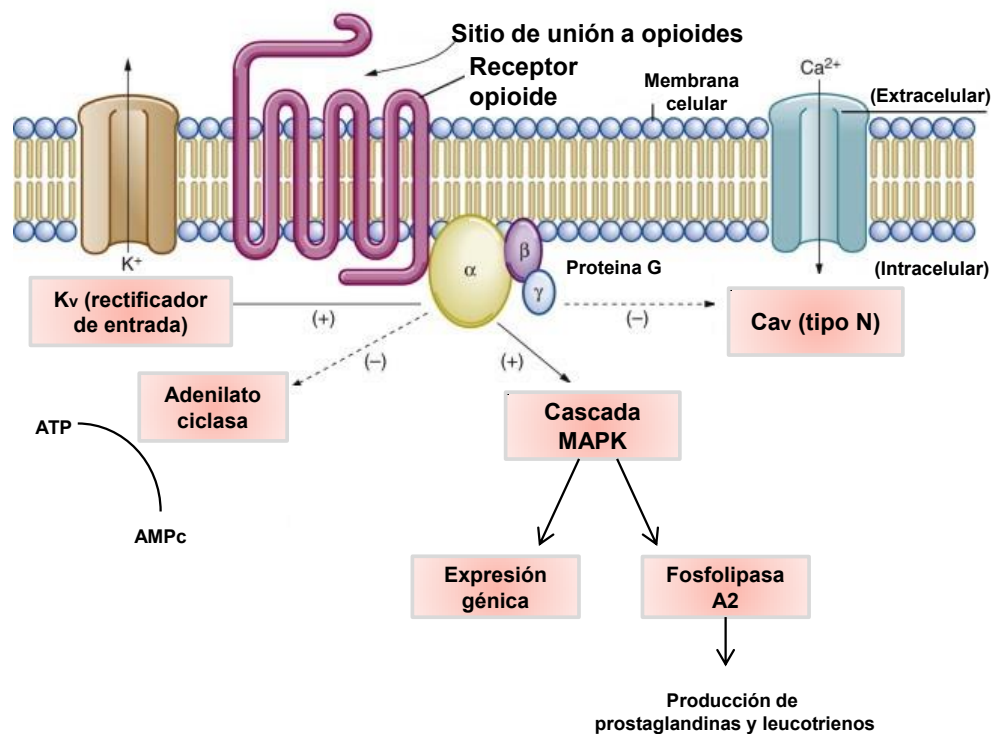


Figura 1.17. Mecanismos de transducción de los receptores opioides. Tras la unión con el ligando endógeno o fármacos opioides, los receptores activan una proteína G (formada por las subunidades α , β y γ) dando lugar a la inhibición de la adenilato ciclasa, el cierre de canales de Ca_v y la apertura de los K_v , o la activación de la cascada MAPK que inician cascadas de señalización, vía activación de la fosfolipasa A2 y también regulando la expresión génica. La mayoría de estas acciones se traducen a nivel neuronal en la disminución de la excitabilidad celular y la secreción de neurotransmisores. Tomada con modificaciones de Ogura *et al.*, 2013.

Los opioides son eficaces en la mayoría de los dolores agudos y crónicos generados por la lesión tisular y la inflamación subsiguiente; en general son menos útiles en cuadros de dolor neuropático, si bien en los de carácter crónico los pacientes pueden beneficiarse de su capacidad para reducir el componente afectivo del dolor a través de su efecto euforizante. En función de su techo (eficacia) analgésico, los opioides son clasificados en menores (codeína, noscapina, etc.) y mayores (morfina, fentanilo, pentazocina, etc.) Los primeros se incluyen en el segundo escalón de la escalera analgésica de la OMS, administrándose solos o en combinación con AINE para el tratamiento. Los opioides mayores constituyen, aún en la actualidad, la piedra angular del tratamiento del dolor de elevada intensidad, formulándose de múltiples maneras para su administración por las vías y con los dispositivos (p. ej., bombas para la autoadministración intratecal) más diversos al objeto de conseguir la máxima eficacia al tiempo que se minimizan los efectos adversos (síndrome de abstinencia), pues suelen ser éstos los que limitan su uso clínico.

En el segundo peldaño se encuentran también fármacos como el tramadol y el tapentadol que si bien muestran una escasa actividad opioide presentan una eficacia analgésica superior a la de los opioides menores debido a su capacidad para inhibir la recaptación neuronal de 5-HT y NA (Jung *et al.*, 2010).

1.1.9.3. Antidepresivos

Una característica común de todos los antidepresivos comercializados hasta el momento es su capacidad de incrementar los niveles de monoaminas, 5-HT, NA y en algunos casos también de dopamina (DA) mediante la inhibición de su recaptación por las terminaciones nerviosas. Debe señalarse que el efecto analgésico de estos compuestos es independiente del efecto antidepresivo, pues si bien a nivel molecular el mecanismo de acción es el mismo, ambos efectos se relacionan con estructuras cerebrales distintas. Entre los antidepresivos disponibles en el mercado tenemos los antidepresivos tricíclicos clásicos (amitriptilina, imipramina, desipramina) que son los que han demostrado una mayor eficacia analgésica (neuropatía diabética, neuralgia postherpética, dolor de origen central, fibromialgia), aunque presentan una elevada incidencia de efectos adversos (debido a su acción anticolinérgica, antihistamínica y antiadrenérgica (receptor $\alpha 1$). Los nuevos antidepresivos de acción dual (inhibidores de la recaptación de NA y 5-HT) como la duloxetina y la venlafaxina poseen una mejor relación beneficio-riesgo, por lo que progresivamente han ido sustituyendo en la clínica a los antidepresivos clásicos. Entre todos los antidepresivos actualmente existente, los inhibidores selectivos de la recaptación de 5-HT (fluoxetina, paroxetina, sertralina) son los que presentan un menor efecto analgésico específico (migraña, fibromialgia; *Alamo et al., 2005; Saarto y Wiffen, 2007; Rang y Dale., 2008*). A diferencia de los analgésicos clásicos, el efecto de los antidepresivos sobre el dolor neuropático se observa después de un tratamiento prolongado (*Sindrup et al., 2005*), lo que sugiere la participación de fenómenos de plasticidad receptoral.

1.1.9.4. Anticonvulsivantes

Los anticonvulsivantes actúan como depresores de la excitabilidad neuronal y de la transmisión sináptica, lo que justificaría un efecto analgésico selectivo en el dolor neuropático (*Field et al., 2007*). Entre los mecanismos de acción de estos fármacos se encuentran: i) potenciación del GABA, facilitando la apertura de canales de Cl^- asociados al receptor de GABA tipo A: barbitúricos, benzodiacepinas; ii) inhibición de la función de los canales Na_v uniéndose al estado abierto o inactivo de los mismos: fenitoína, carbamazepina, topiramato (*Carey et al., 2016*), y iii) la inhibición de los canales Ca_v mediante la interacción con la subunidad $\alpha 2\beta$: gabapentina, pregabalina (*Todd et al., 2012*). Los anticonvulsivantes son de particular utilidad en la neuralgia postherpética, algunas cefaleas, neuropatía diabética, dolor postquirúrgico y fibromialgia, pudiéndose usar solos o en combinación con otros analgésicos.

1.1.9.5. Ketamina

La ketamina es un derivado de la fenciclidina con efecto antagonista de los receptores NMDA. Se utilizó procedimientos que requieren anestesia general debido a sus efectos amnésicos

y analgésicos. A dosis inferiores a las anestésicas puede utilizarse por vía parenteral para reducir la utilización de fármacos opioides en el tratamiento del dolor postoperatorio y de algunas formas de dolor agudo y crónico en pacientes con tolerancia a los opioides (Casale et al., 2017; Lener et al., 2017).

1.1.9.6. Agonistas de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos

Los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos (xilacina, medetomidina, dexmedetomidina, etc.) son ampliamente utilizados en medicina veterinaria como medicación preanestésica y en protocolos de anestesia total intravenosa en intervenciones de duración corta-intermedia (inferior a 2 horas). En general, su marcado efecto sedante ha limitado su utilización como analgésicos por vía sistémica. Administrados por vía tópica (parche cutáneo) o local (epidural o mediante infiltración de nervios periféricos) pueden resultar útiles para el tratamiento de algunos dolores crónicos, intervenciones ortopédicas, etc. Es frecuente su combinación con anestésicos locales y opioides. La práctica totalidad de los efectos de estos fármacos son debidos a una acción selectiva sobre los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos de carácter agonista. El efecto analgésico deriva fundamentalmente de su acción a nivel de la médula espinal en la que la activación de receptores $\alpha 2$ adrenérgicos conlleva la inhibición de la liberación de neurotransmisores por las terminaciones centrales de las neuronas nociceptivas primarias así como la reducción de la excitabilidad de las neuronas nociceptivas secundarias. Adicionalmente un incremento de la actividad de la vía descendente inhibitoria dependiente de sus efectos sobre el LC ha sido implicado en algunos modelos de dolor neuropático. Estos fármacos ejercen un efecto simpaticolítico tanto a nivel central (bulbo raquídeo) como periférico (terminaciones nerviosas de las neuronas postganglionares) responsables de la depresión cardiovascular que suele acompañar su uso en la clínica. Los agonistas $\alpha 2$ producen también una marcada sedación y emesis (dependiente de la especie animal) de origen central así como un efecto diurético rápido. En función de una acción directa sobre el músculo liso pueden producir vasoconstricción y contracción del útero (Makau et al., 2016; Nahman-Averbuch et al., 2016; Di Cesare et al., 2017).

1.1.9.7. Otros fármacos analgésicos y coadyuvantes

En este apartado cabe mencionar a los cannabinoides, que encuentran actualmente indicación en el tratamiento del dolor y espasticidad muscular de los pacientes con esclerosis múltiple. En la categoría de fármacos adyuvantes se incluyen relajantes musculares de acción central como las benzodiacepinas y el baclofeno que frecuentemente se usan para el tratamiento de dolores causados por contracturas musculares (cefaleas de tensión, dolor cervical, espasticidad secundaria e ictus) y los corticoesteroides (prednisona, dexametasona) que se emplean en algunas neuropatías periféricas (pinzamientos vertebrales; Marino e Idris, 2017).

1.1.9.8. Otras terapias tópicas y locales

La administración tópica y local presenta la ventaja de requerir menores cantidades de fármacos y la de limitar sus efectos al punto de administración, lo que tiende a limitar los efectos sistémicos de los mismos.

1.1.9.8.1. Capsaicina

La capsaicina, es un agonista natural del canal TRPV1, presente en los frutos de plantas del género *Capsicum*. La administración tópica de capsaicina (parches al 8%) produce la desensibilización de los nociceptores cutáneos en los que se encuentra su receptor, lo que conduce a un efecto analgésico duradero. Su uso no está exento de efectos adversos como el calor y la irritación en el punto de aplicación producido por la activación inicial de los canales TRPV1. En animales muy jóvenes la administración de capsaicina por vía sistémica puede producir la destrucción de las fibras C peptidérgicas (Sommer *et al.*, 2016).

1.1.9.8.2. Anestésicos locales

Los anestésicos locales bloquean la génesis y propagación de los potenciales de acción mediante la inhibición de los canales Na_v . En general, los anestésicos locales bloquean con mayor facilidad la conducción en las fibras de menor diámetro encargadas de la transmisión dolorosa, aunque rara vez es posible provocar un bloqueo de la sensación dolorosa sin afectar también a otras modalidades sensitivas.

En la práctica clínica es frecuente la administración de anestésicos locales para obtener el bloqueo de la conducción de nervios periféricos en el contexto de intervenciones dentales, ortopédicas, etc. Por otra parte, la lidocaína en administración tópica (parches al 5%) constituye un tratamiento eficaz y seguro de la neuropatía diabética, la fascitis y el dolor de espalda crónico; además algunos anestésicos locales como la mexiletina y la lidocaína pueden ser utilizadas por vía sistémica (oral o intravenosa) para el tratamiento de neuropatías periféricas (alcohólica o diabética). El bloqueo de los subtipos específicos de los canales de Na^+ constituye una estrategia prometedora para el tratamiento del dolor neuropático, aunque los anestésicos locales disponibles en la actualidad no distinguen entre los distintos subtipos de Na_v (Lai *et al.*, 2004).

1.1.9.8.3. Toxinas

La toxina botulínica A, producida por la bacteria *Clostridium botulinum*, es una potente neurotoxina que inhibe la liberación de acetilcolina (ACh) en las terminaciones nerviosas de las motoneuronas, lo que resulta en una parálisis muscular persistente. Este efecto resulta eficaz en el tratamiento del dolor asociados a contracturas musculares persistentes (p.ej. post-ictus, tortícolis). Además, esta toxina bloquea la exocitosis de neurotransmisores implicados en la señalización

nociceptiva, incluyendo el glutamato, la SP y el CGRP, lo que se traduce en la inhibición de la sensibilización central y periférica así como de la inflamación neurogénica característica del dolor crónico (Oh *et al.*, 2015).

Por otra parte, la ziconotida es una toxina producida por la especie de caracol *Conus magus* que se emplea por vía intratecal en pacientes con dolor crónico intenso que no responden a terapias analgésicas convencionales o padecen de efectos secundarios importantes. La ziconotida ejerce sus efectos analgésicos por medio del bloqueo de los canales Ca_v de tipo N de las terminaciones nerviosas nociceptivas del asta dorsal de la médula espinal (Carretero, 2008).

1.2. El estrés

En la actualidad se concibe el estrés como una amenaza a la homeostasia que se manifiesta con cierto grado de especificidad dependiente, entre otros aspectos, del agente estresante, de la percepción del mismo por el individuo y de la capacidad de éste para hacerle frente (McEwen y Stellar, 1993; Pacak *et al.*, 1998; Goldstein y McEwen, 2002; Goldstein y Kopin, 2007). Dicha especificidad se basaría en la existencia de patrones diferenciados en la respuesta secretora de cortisol, A y NA (Pacak y Palkovits, 2001; Goldstein, 2003). Posiblemente, la definición más aceptada –o al menos, la más frecuentemente recogida en la literatura– de estrés sea la de Goldstein (Goldstein, 1995), que lo considera una “condición en la que las expectativas del sujeto, tanto si están programadas genéticamente como si son consecuencia de un proceso de aprendizaje, no coinciden con las percepciones presentes o anticipadas provenientes del medio interno y/o externo, siendo esta discrepancia entre lo que se observa o siente y lo que se espera la que desencadena una respuesta compensadora de estrés”. Para ello, el organismo dispondría de numerosos comparadores orgánicos denominados homeostatos que regularían la actividad de los distintos sistemas efectores. Por otra parte, Goldstein emplea el término *distress* como una forma de estrés con características adicionales como la consciencia, índole aversiva y activación del eje hipotálamo, hipófisis- adrenal (HPA), incluyendo el sistema simpatoadrenomedular.

El impacto del estrés sobre el organismo está relacionado tanto con la intensidad como con la duración del mismo, pudiéndose distinguir dos situaciones: i) estrés agudo. Correspondería a la fase de alarma del síndrome general de adaptación (SGA; Selye, 1946) en la que predominarían los efectos de las CAs secretadas por la médula adrenal y las terminaciones nerviosas del SNS, aunque no pueden excluirse totalmente efectos a más largo plazo vía activación del eje HPA; ii) estrés crónico. Abarca, además de la fase de alarma, la fase de resistencia del SGA. Si el estímulo causante persiste demasiado tiempo o si es muy intenso puede conducir a la fase de agotamiento. El estrés crónico puede producirse como consecuencia tanto de un estrés prolongado como de un estrés agudo repetido a lo largo del tiempo (Figura 1.18).

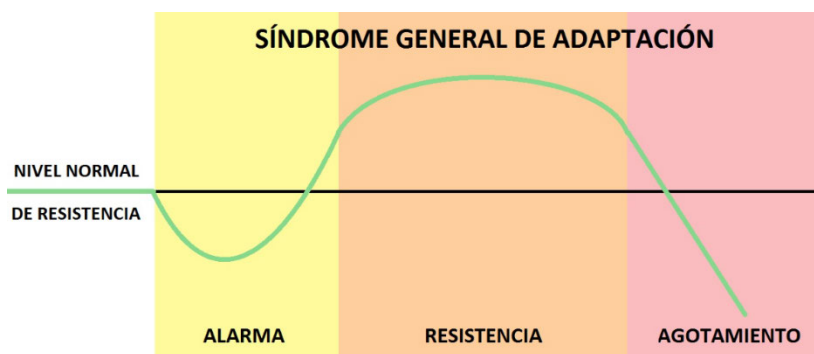


Figura 1.18. Esquema representativo de las fases del síndrome general de adaptación. Adaptado de Selye, 1946.

Tanto el estrés agudo como el crónico pueden traducirse en respuestas maladaptativas. La moderna psicobiología emplea los términos *alostasia* y *carga o sobrecarga alostásica* para diferenciar las respuestas eficaces de las que no permiten cumplir con su función adaptativa. El término *alostasia* (*conseguir la estabilidad a través del cambio*) fue introducido por Sterling y Eyer (1988) para referirse al proceso activo por el que el organismo responde a los sucesos cotidianos para mantener la homeostasia. Por su parte, el concepto de *carga o sobrecarga alostásica* hace referencia al desgaste del organismo causado por una ineficaz gestión *alostásica*. Habitualmente, la carga alostásica se asocia con respuestas inadecuadas (ausencia de la correcta proporcionalidad en relación con la intensidad del estímulo), diferidas o prolongadas respecto al inicio o duración del estímulo, así como con la incapacidad de mostrar el patrón de facilitación o depresión característico de la respuesta alostásica frente a la estimulación repetida (McEwen y Stellar, 1993; McEwen, 1998; McEwen y Wingfield, 2003).

Las vías aferentes que transmiten información procedente del medio interno y/o externo pueden ser directas (por ejemplo, neuronas hipotalámicas que actúan como glucostatos o termostatos) e indirectas, mediante vías nerviosas aferentes constituidas por las fibras sensitivas del SNP. Estas últimas pueden esquematizarse del modo siguiente: a) aferencias vehiculadas por los pares craneales (fundamentalmente el X par craneal o nervio vago), que alcanzan el tronco del encéfalo (núcleo del tracto solitario, área postrema, médula ventrolateral, núcleos del rafe, formación reticular, LC y núcleo parabranchial) donde hacen sinapsis y parten proyecciones que remiten información a los núcleos del tálamo; b) aferencias procedentes del resto del organismo a través de la médula espinal. Existen dos rutas aferentes medulares principales: 1ª) la vía lemniscal, en la que las fibras de las neuronas sensitivas secundarias se integran en los cordones posteriores ipsilaterales de la médula espinal para alcanzar los núcleos troncoencefálicos. Desde éstos, parte una tercera neurona que alcanza el tálamo ventrobasal; y 2ª) la vía extralemniscal, en la que las fibras de las neuronas sensitivas primarias hacen sinapsis en las láminas I y II de las astas dorsales contralaterales de la médula espinal, donde se sitúa la segunda neurona que asciende por el

fascículo espinotalámico hasta el tálamo posterior. Independientemente de la vía de acceso, desde los núcleos del tálamo parten proyecciones hasta muy distintas regiones de la corteza cerebral (Palkovits y Brownstein, 1985; Kvetnansky et al., 2009).

El sistema eferente vehicula información desde los centros integradores del cerebro hacia la periferia. Consta de dos vías principales: la vía humoral, dependiente de la activación del eje HPA, y la vía neural, que desde el tronco del encéfalo y mediante las denominadas neuronas premotoras alcanza los somas de las neuronas preganglionares simpáticas situadas en el asta intermediolateral de la médula espinal. Debe señalarse que también desde el hipotálamo parten fibras descendentes que llegan bien directamente (monosinápticamente) o mediante el establecimiento de sinapsis con neuronas catecolaminérgicas troncoencefálicas hasta las neuronas preganglionares de los segmentos torácicos de la médula espinal. Además de las neuronas catecolaminérgicas del tronco del encéfalo, las neuronas no catecolaminérgicas de la médula oblongada y las neuronas serotoninérgicas del rafe también alcanzan las neuronas preganglionares simpáticas. Todas estas neuronas son conocidas como neuronas premotoras simpáticas.

Las fibras preganglionares simpáticas abandonan la médula espinal por las raíces ventrales de los nervios espinales y las ramas comunicantes blancas (fibras mielínicas). La mayoría de estas fibras hace sinapsis en los ganglios simpáticos de las cadenas paravertebrales. En estos ganglios se sitúan los somas de las neuronas simpáticas postganglionares cuyos axones se unen a los nervios espinales a través de las ramas comunicantes grises (fibras amielínicas) para alcanzar sus destinos periféricos. En cambio, las fibras postganglionares que inervan las vísceras abdominales y pélvicas tienen sus cuerpos celulares en ganglios prevertebrales impares (celíaco, mesentérico superior e inferior y aortorrenal) situados en la cavidad abdominal. La única excepción a la organización bineuronal del SNS concierne a la médula adrenal (Kvetnansky et al., 2009).

Entre las estructuras cerebrales donde se integra la información relacionada con el estrés cabe destacar el sistema límbico, el hipotálamo, la corteza temporal y frontoparietal. El hipotálamo, constituye el principal centro integrador de la respuesta autonómica. Desde el hipotálamo parten proyecciones hacia regiones troncoencefálicas donde se sitúan los somas de las neuronas premotoras que regulan la actividad de las divisiones simpática y parasimpática del sistema nervioso autónomo (SNA).

1.2.1. El sistema nervioso simpático y el dolor

El dolor intenso o crónico es uno de los estímulos más estresantes e incapacitantes que existen. Aunque durante mucho tiempo la perspectiva biológica dominó el estudio del dolor poco a poco fueron adquiriendo relevancia los aspectos psicológicos y sociales. Por otra parte, también el estrés sería capaz de modular la percepción del dolor. Un efecto bien descrito de diversos estresores

agudos, tanto en animales como en el hombre, es la analgesia, la cual estaría mediada por las vías espinales inhibitorias descendentes tanto a través de mecanismos opioides como no opioides (noradrenérgicos fundamentalmente). Por el contrario, diversas formas de dolor crónico como la fibromialgia, la migraña, etc., pueden ser desencadenadas o exacerbadas por estrés, a través de circuitos neuronales insuficientemente conocidos (*Bandler et al., 2000a*).

A nivel periférico, la señalización adrenérgica media la mayoría de los efectos del SNS. El SNS forma parte del SNA y es clásicamente conocido por participar en las respuestas tipo “lucha o huida” frente a estímulos estresantes agudos (ejercicio intenso, combate, emociones intensas, etc.). La relación entre el SNA y el dolor es un campo controvertido; así el dolor agudo constituiría una situación análoga a la de “lucha o huida” en la que la activación del SNS puede resultar beneficiosa puesto que atenuaría la sensación de dolor; sin embargo, en situaciones de dolor crónico como en el que acontece en pacientes que sufren el síndrome doloroso regional complejo (SDRC) la activación del SNS puede provocar la acentuación y perpetuación del mismo (*Bardin et al., 2009*). La implicación del SNS en el dolor crónico se basa en la capacidad de los bloqueantes neuronales noradrenérgicos, como la guanetidina o el bretilio, para reducir el dolor en modelos animales generados por lesiones de nervios periféricos, y se ha tratado de explicar mediante la influencia directa o indirecta de las CAs (la NA liberada por las terminaciones nerviosas noradrenérgicas o la A liberada por las células cromafines por la médula adrenal) sobre los nociceptores (*Jänig, 2009*).

1.2.1.1. Respuesta del sistema nervioso simpático durante el dolor

El SNA es un sistema eferente de múltiples vías funcionales que transmiten información desde la médula espinal o el tronco encefálico hasta las células efectoras en la periferia corporal. Cada neurona simpática o parasimpática periférica está directa o indirectamente conectada a distintas redes neuronales de la médula espinal, tronco encefálico e hipotálamo, desde las que se ejerce la regulación precisa de los órganos diana (regulación cardiovascular, termorregulación, etc.).

Un estímulo agudo o una lesión crónica en los tejidos es capaz de activar el SNS generando respuestas de carácter general y, sin embargo, dotadas de una razonable especificidad. Las respuestas generalizadas se orquestan a nivel de la médula espinal, tronco encefálico e hipotálamo adoptando diferentes patrones. El primer patrón conduce a luchar y un segundo más elaborado, a avanzar evitando. Ambos implican la activación de las columnas lateral y dorsolateral de la SGP del mesencéfalo, que conectan de forma bidireccional con los centros autonómicos del tronco encefálico y del hipotálamo. Las respuestas del SNS adquieren además la consideración de reflejos somatosimpáticos y viscerosimpáticos, en los que las neuronas aferentes son sensitivas, incluyendo las nociceptivas (piel, tejidos somáticos profundos y vísceras), y las neuronas eferentes son las simpáticas que inervan los vasos sanguíneos, las glándulas sudoríparas, el sistema nervioso

entérico, entre otras estructuras (Bandler y Shipley, 1994; Bandler et al., 2000a; 2000b; Keay y Bandler, 2004).

Los somas de las neuronas sensitivas primarias de las vísceras torácicas y abdominales se localizan en los DRGs y en el ganglio nodoso del nervio vago. Normalmente, las neuronas aferentes vagales vehiculan información sobre parámetros fisiológicos (temperatura, tensión, etc.) aunque algunas de ellas participan también en la nocicepción (Undem y Weinreich, 2005; Bielefeldt y Gebhart, 2006).

1.2.1.1.1. Participación del sistema nervioso simpático en la generación del dolor

El SMP conlleva tanto dolor espontáneo como dolor inducido por estímulos mecánicos o térmicos, pudiendo estar presente en el SDRC tipo I (sin lesión nerviosa) y tipo II (con lesión nerviosa), así como en cuadros de origen central (ictus). La implicación del SNS en la generación del dolor se basa en las siguientes observaciones clínicas (Bonica, 1990):

(1) La activación de las neuronas simpáticas postganglionares produce dolor espontáneo, alodinia mecánica y térmica al frío (umbral de dolor frío de aproximadamente 15 °C) en la extremidad superior de los pacientes con SDRC; (2) la administración de anestésicos locales en el ganglio cervicotorácico (ganglio estrellado) de pacientes con SDRC II y en los ganglios paravertebrales de sujetos con SDRC I puede aliviar el dolor; (3) la inyección intradérmica de NA reaviva la sintomatología dolorosa en la extremidad afectada en pacientes con SDRC II, sin inducir efecto alguno en la extremidad contralateral, y (4) la mayoría de los pacientes tratados con bloqueantes α -adrenérgicos no selectivos (fentolamina) o guanetidina de forma intravenosa refieren una disminución de la sintomatología dolorosa (Raja et al., 1991; Jänig y Baron, 2001; 2002; 2003; Jänig, 2009; **Figura 1.19**).

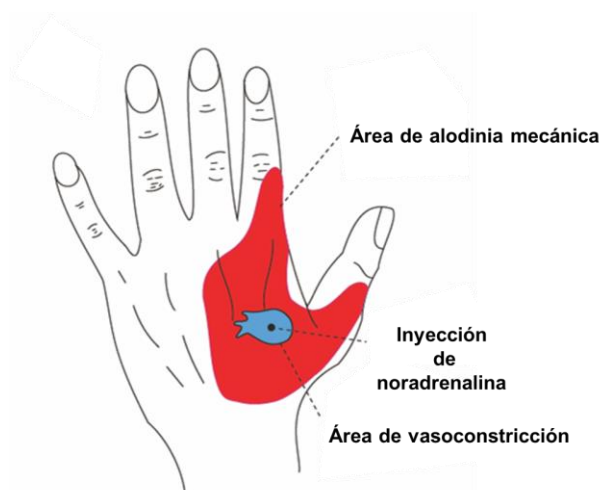


Figura 1.19. Alodinia mecánica inducida por la inyección intradérmica de noradrenalina en pacientes con SDRC tipo II. La inyección intradérmica de noradrenalina (2 μ g) induce vasoconstricción y palidez en el área inmediatamente adyacente a la inyección y una zona más extensa de alodinia mecánica en la extremidad afectada del paciente. Tomada con modificaciones de Jänig, 2006.

1.2.1.1.2. Contribución del sistema nervioso simpático en la generación de dolor secundario a la lesión de un nervio periférico

La contribución del SNS en la generación o el mantenimiento del dolor tras una lesión nerviosa se ha relacionado con modificaciones de la innervación simpática, la expresión de receptores adrenérgicos y/o de la actividad de la glándula adrenal.

-Modificaciones en la innervación simpática-

En el SNC del adulto los axones apenas se regeneran después de una lesión. Esta falta de regeneración puede atribuirse a la disminución de moléculas promotoras y aumento de las inhibidoras del crecimiento neural en el entorno de la lesión. Incluso cuando los axones son capaces de regenerarse, raramente se dirigen a las neuronas postsinápticas correctas o forman conexiones sinápticas que restauran la función original (Jänig, 2006; 2009). En distintos modelos animales de lesión (sección y diversas modalidades traumáticas de los nervios periféricos) se ha observado que las fibras postganglionares simpáticas que normalmente acompañan a los vasos sanguíneos se ramifican y emiten prolongaciones (*sprouting*) invadiendo la zona lesionada durante las 2-3 semanas posteriores a la instauración de la misma. Dicho aumento de la innervación simpática ha sido constatado tanto en los ganglios espinales (aparecen fibras catecolaminérgicas entre los somas de las neuronas DRG) como en las proyecciones centrífugas (axones y nociceptores de la piel) como centrípetas de los mismos (nervios espinales). Así mismo, en estos animales la estimulación de las fibras simpáticas inhibe la actividad de la mayoría de las fibras A (mielínicas) y C (amielínicas) registradas con electrodos extracelulares, siendo únicamente las altas frecuencias de estimulación (5-20 Hz) las que consiguen activar las neuronas DRGs (McLachlan *et al.*, 1993; Devor *et al.*, 1994; Chen *et al.*, 1997; Michaelis *et al.*, 2000). Cabe señalar también que el incremento de las terminaciones de las neuronas simpáticas postganglionares alrededor de las neuronas DRGs y en la piel innervada por las fibras del nervio lesionado posibilitaría la existencia de un tono noradrenérgico local que junto a las CAs circulantes puede contribuir al dolor espontáneo y la alodinia que se observa en los pacientes y animales con lesiones traumáticas de los haces nerviosos (Liu *et al.*, 2000; López *et al.*, 2003; **Figura 1.20**).

En este proceso de remodelación axonal intervienen moléculas biológicamente activas denominadas factores neurotróficos (NGF; BDNF; NT-3, neurotrofina-3) que durante el desarrollo permiten además del crecimiento axonal, la orientación y formación de las sinapsis apropiadas. En el adulto, estos factores contribuyen a la supervivencia neuronal, la plasticidad y la función sináptica (Novikova *et al.*, 2000., Lu *et al.*, 2001). El mecanismo por el que el NGF participa en las modificaciones de la innervación simpática es un área de intenso estudio. Se ha descrito que su

expresión en la médula espinal induce la regeneración de los axones de las neuronas nociceptivas (Gwak *et al.*, 2003) actuando sobre receptores con actividad TrkA y p75NTR (Pearson *et al.*, 2001; Yuan *et al.*, 2003).

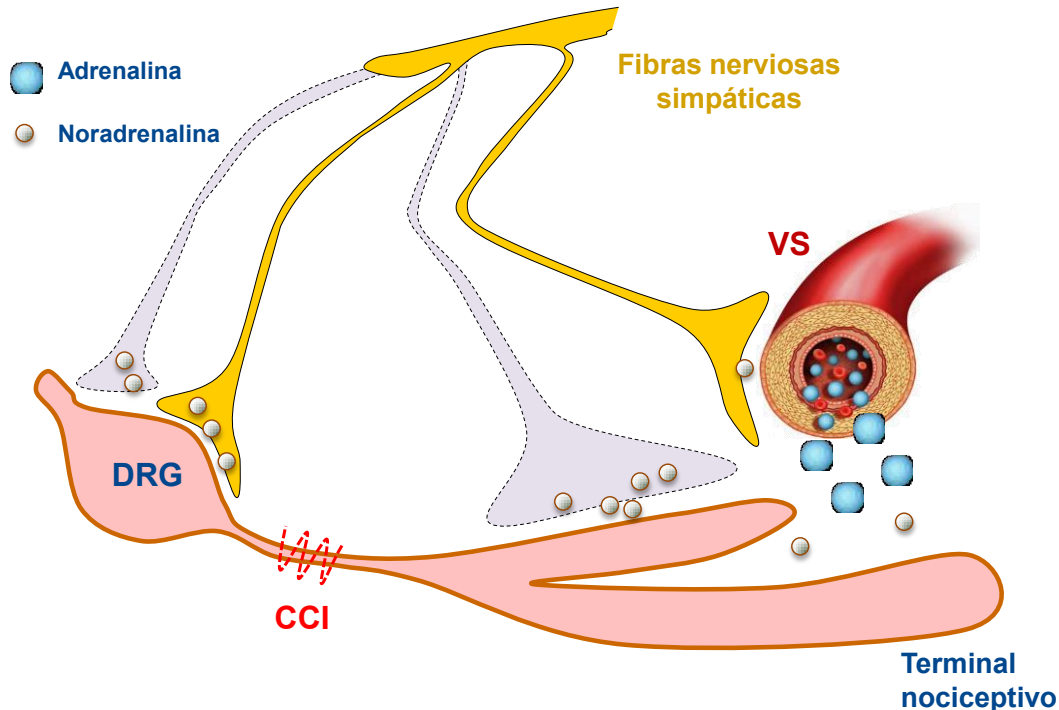


Figura 1.20. Aumento de la inervación simpática (sprouting) tras lesión de nervios periféricos. Se observa un patrón de inervación simpática normal (amarillo) y el incremento de las fibras simpáticas noradrenérgicas (gris) tras la lesión nerviosa (CCI). En condiciones normales las terminaciones de las fibras simpáticas acompañan a los vasos sanguíneos (VS), mientras que en condiciones patológicas aumenta su densidad, emitiendo sus proyecciones hacia los ganglios espinales (DRG) y en la vecindad de los nociceptores.

Con independencia de su efecto sobre las terminaciones nerviosas nociceptivas de la piel, el SNS influye también sobre el tono vascular arteriolar a ese nivel. Así, el aumento de la inervación simpática puede traducirse en una mayor vasoconstricción, que eventualmente puede traducirse en isquemia, con la consecuente acidosis y estimulación de los nociceptores. Es de destacar que el aumento de la actividad simpática trae además como consecuencia una alteración de la regulación del flujo sanguíneo de la piel durante la inflamación neurogénica ya que contrarrestaría el efecto vasodilatador de las fibras nociceptivas sobre las arteriolas pero no sobre las vénulas postcapilares dando lugar a la aparición de una respuesta inflamatoria con marcado carácter edematoso (Koltzenburg *et al.*, 1995; **Figura 1.21**).

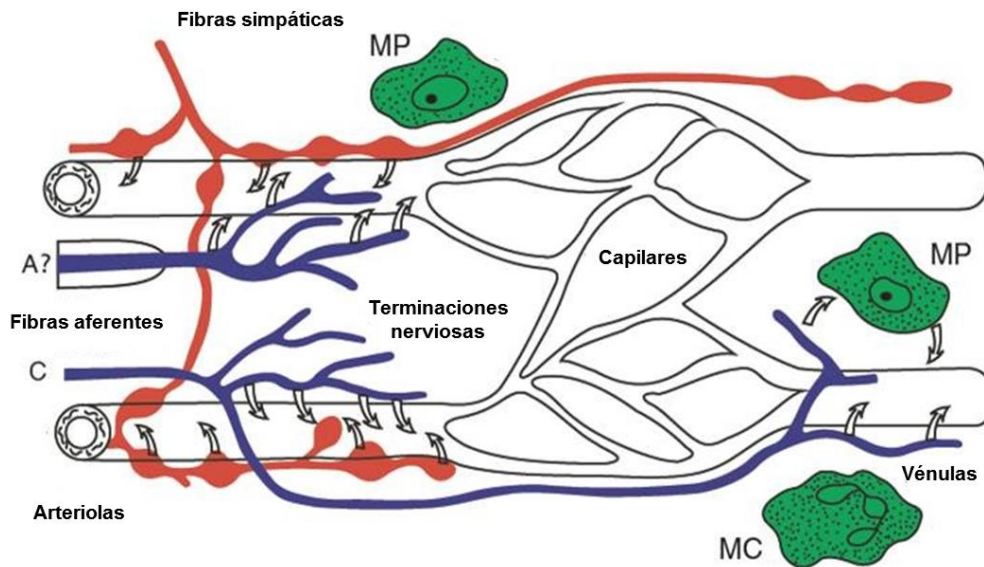


Figura 1.21. El microambiente de los nociceptores de la piel. El lecho vascular se compone de arteriolas (directamente inervadas por fibras simpáticas y aferentes (A α y C)), capilares (no inervados y no influenciados por fibras nerviosas), y vénulas (no directamente inervadas pero sí influenciadas por las fibras nerviosas). El microambiente interviene en la regulación del lecho vascular mediante varios mecanismos: la actividad de las fibras simpáticas postganglionares que causa vasoconstricción arteriolar; la excitación de aferentes primarios (fibras A α y C) tanto por estímulos nocivos como inocuos, provoca vasodilatación en arteriolas precapilares y la extravasación de plasma en vénulas postcapilares (sólo fibras C) mediante la liberación de SP, CGRP y otros compuestos vasoactivos. Estas sustancias pueden actuar directamente o mediante la liberación de otros compuestos por células del sistema inmune: mastocitos (MC) y macrófagos residentes (MP). Tomada con modificaciones de Jänig, 2006.

-Cambios en la expresión de adrenoreceptores

La inyección sistémica de A y NA provoca los mismos efectos excitadores e inhibidores en las neuronas sensitivas primarias lesionadas que los que se obtienen al estimular las neuronas simpáticas postganglionares. La marcada sensibilidad de estos efectos a los antagonistas de los receptores adrenérgicos sugiere que podrían estar mediando este fenómeno.

Los mecanismos celulares del aumento de la sensibilidad a las CAs no son del todo conocidos, pero podrían relacionarse con una mayor expresión de adrenoreceptores o con cambios en los mecanismos de transducción que conllevaran la adquisición de una mayor o nueva capacidad funcional (Pertovaara, 2013). Los adrenoreceptores se expresan también ampliamente en las células del sistema inmune lo que sugiere que podrían desempeñar un papel clave en la modulación de las respuestas inmunológicas, cruciales en la fisiopatología de las lesiones medulares y cerebrales traumáticas que se caracterizan por tener un fuerte componente inflamatorio (Lemmens et al., 2014)

El subtipo de adrenoreceptor que predomina en el acoplamiento simpático-sensitivo a nivel periférico y en los somas de las neuronas DRG en los modelos experimentales de roedores es el α_2 (Chen et al., 1996). Su activación ejercería un efecto pronociceptivo relacionado con el aumento de la excitabilidad neuronal dependiente de la inhibición de las corrientes a través de los canales Ca_v y

de la potenciación de las mediadas por los receptores P2X3; sin embargo, su capacidad para inhibir la actividad de los canales TRPV1, conduciría al efecto contrario (*Chakraborty et al., 2017*). Es probable que dependiendo de la localización del receptor (terminaciones periféricas o centrales, soma neuronal), del número de receptores funcionales y del tipo de fibra sensitiva los efectos mediados por estos receptores puedan diferir notablemente.

Los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos (fundamentalmente, el subtipo $\alpha 1A$) también se localizan en las terminaciones periféricas y el soma de las neuronas nociceptivas primarias (*Sato y Perl, 1990; Shi et al., 2000; Pertovaara, 2013*), donde facilitarían el aumento de excitabilidad de las motoneuronas, a través de la facilitación de las corrientes de Ca^{2+} a través de canales Ca_v de bajo umbral de activación (tipo T), capaces de inducir el disparo de ráfagas de potenciales de acción (*Rango et al., 2010; Pertovaara, 2013*). Así mismo, se ha descrito su presencia en linfocitos y macrófagos lo que posibilitaría un efecto inmunomodulador y proinflamatorio mediante el aumento de la producción de IL-1 β (*Kavelaars et al., 2002*).

Por su parte, los receptores $\beta 2$ adrenérgicos se localizan en las neuronas nociceptivas primarias así como en leucocitos mononucleares (*Landmann, 1992*) y células gliales (*Salm y McCarthy, 1992; Stone y Ariano, 1989*). La contribución de los receptores $\beta 2$ adrenérgicos a la sensibilidad dolorosa se ha relacionado con la capacidad de la A para producir hiperalgesia tras la inyección local (cutánea) o sistémica a ratas (*Khasar et al., 1999a; Khasar et al., 1999b; Aley et al., 2001; Khasar et al., 2003*). Además, la administración crónica de agonistas de los receptores β -adrenérgicos produce un síndrome similar a la artritis dolorosa (*Vyden et al., 1971*).

Finalmente debe señalarse que tanto los receptores $\alpha 2$ como $\beta 2$ adrenérgicos se comportan como autorreceptores, inhibiendo o facilitando respectivamente la liberación de NA por las terminaciones nerviosas de las neuronas simpáticas postganglionares.

-Modificaciones en la actividad de la glándula adrenal-

En contraposición al concepto original de Cannon de un SNS unitario, hoy se considera que los sistemas catecolaminérgicos periféricos pueden estar regulados diferencialmente por distintos estresores contribuyendo de forma diferente a la respuesta de estrés. Así, numerosas evidencias indican que la activación del sistema simpato neuronal está asociada con la reacción activa de la respuesta de estrés (lucha o huida), mientras que la activación del sistema simpato adrenal estaría asociada a la reacción pasiva (paralización, miedo; *Goldstein y Kopin, 2008*). En consecuencia, la liberación de A y NA son dependientes del tipo de estrés. Así, la A procedente de la médula adrenal se libera fundamentalmente en respuesta a la hipoglucemia (p. ej., el ejercicio físico extenuante o la inyección de insulina), la inmovilización o el estrés psíquico. Por otra parte, el dolor o el frío inducen preferentemente la liberación de NA por las terminaciones nerviosas

simpáticas (Kvetnansky *et al.*, 1998; Pacak *et al.*, 1998).

El grupo de Levine ha descrito una nueva forma de regulación del sistema simpatoadrenal relacionada con la actividad de las fibras sensitivas del nervio vago que inervan el tubo digestivo (Khasar *et al.*, 1999a; Khasar *et al.*, 1999b; Aley *et al.*, 2001; Khasar *et al.*, 2003). La vagotomía subdiafragmática se asocia al aumento de la actividad en el nervio esplácnico que inerva la médula adrenal con el consiguiente incremento de la secreción de A que a nivel de los nociceptores cutáneos mediaría una hiperalgesia mecánica y química (Foreman, 1989; Randich y Gebhart, 1992; Jänig *et al.*, 2000; **Figura 1.22**). Así mismo, el estrés (estímulo sónico impredecible) también daría lugar a hiperalgesia dependiente de la activación del sistema simpatoadrenal (Khasar *et al.*, 2009).

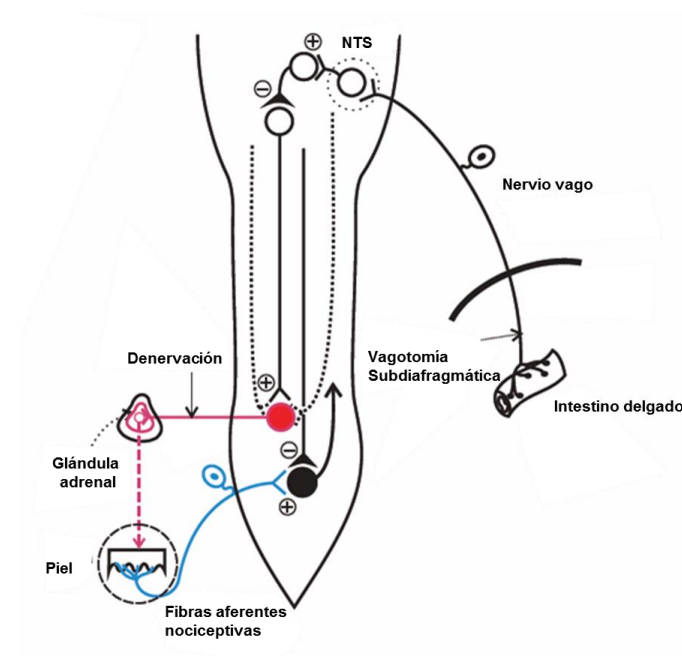


Figura 1.22. Sensibilización de los nociceptores por el sistema simpatoadrenomedular.

Diagrama esquemático que muestra los circuitos neurales que en la médula espinal y el tronco encefálico modulan la sensibilidad de los nociceptores a través del sistema simpatoadrenal. La sensibilidad de los nociceptores cutáneos a la estimulación mecánica o química es aumentada por la A liberada por la médula adrenal (hiperalgesia). La actividad de las fibras que inervan la médula adrenal depende de las vías vagales aferentes del intestino delgado que ejercen un efecto inhibitorio a nivel central. Así, la práctica de una vagotomía subdiafragmática conduce a la activación de la médula adrenal. NTS: núcleo del tracto solitario. Tomada con modificaciones de Khasar *et al.*, 1998b.

1.3. La glándula adrenal

Las primeras referencias a la glándula adrenal de las que se tiene constancia fueron las de Eustachius (1563), Addison (1855) y Brown-Siquard (1856). Las glándulas adrenales se encuentran localizadas en la zona anterior/ventral-superior/craneal de los riñones de los mamíferos, estando irrigadas por las arterias adrenal superior, media e inferior, que proceden de las arterias frénica, aorta y renal, respectivamente (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998). En la mayoría de las especies, la circulación venosa intraglandular confluye en las venas adrenolumbares derecha e izquierda que desembocan en las venas cava y renal, respectivamente.

Cada glándula adrenal se compone de dos tejidos embriológicamente distintos, la corteza y la médula, derivados del mesodermo y neuroectodermo, respectivamente. Durante el desarrollo, un grupo aislado de células conocido como el primordio adrenal-gonadal aparece dentro de la cresta urogenital. Este tejido dará lugar a la corteza adrenal fetal y a las células Leydig. En etapas posteriores del desarrollo, a partir de la sexta semana postconcepción será posible diferenciar en el interior de la corteza un agregado celular que constituirá la médula adrenal (*Vrezas et al., 2003*).

1.3.1. Morfología de la glándula adrenal

1.3.1.1. La corteza adrenal

Se localiza en la periferia de la glándula y participa en la respuesta al estrés mediante la producción y liberación de corticosteroides. Los corticosteroides se clasifican en mineralocorticoides, representados básicamente por la aldosterona y en glucocorticoides (GC), entre los que destacan el cortisol y la corticosterona, y esteroides sexuales, fundamentalmente de naturaleza androgénica.

Los corticoides se forman a partir de un precursor común, el colesterol, el cual es sintetizado a partir de acetato o es captado por las células y vehiculado hasta la membrana mitocondrial interna por la proteína reguladora de la esteroidogénesis. En la mitocondria, el colesterol es hidroxilado por la 20,22-desmolasa (CYP11A1), transformándose en pregnenolona. Una vez formada, la pregnenolona puede ser deshidrogenada y convertida en progesterona, o hidroxilada para dar lugar a 17- α -hidroxipregnenolona (*Flórez, 2013*). Estas reacciones pueden llevarse a cabo en cualquier tejido productor de esteroides, mientras que las transformaciones siguientes tienen lugar específicamente en las células de la corteza adrenal (**Figura 1.23**).

- 1) Progesterona \rightarrow desoxicorticosterona \rightarrow aldosterona
- 2) Progesterona \rightarrow 17- α -hidroxiprogesterona \rightarrow desoxicortisol \rightarrow cortisol
- 3) 17- α -hidroxiprogesterona \rightarrow androstenodiona \rightarrow testosterona

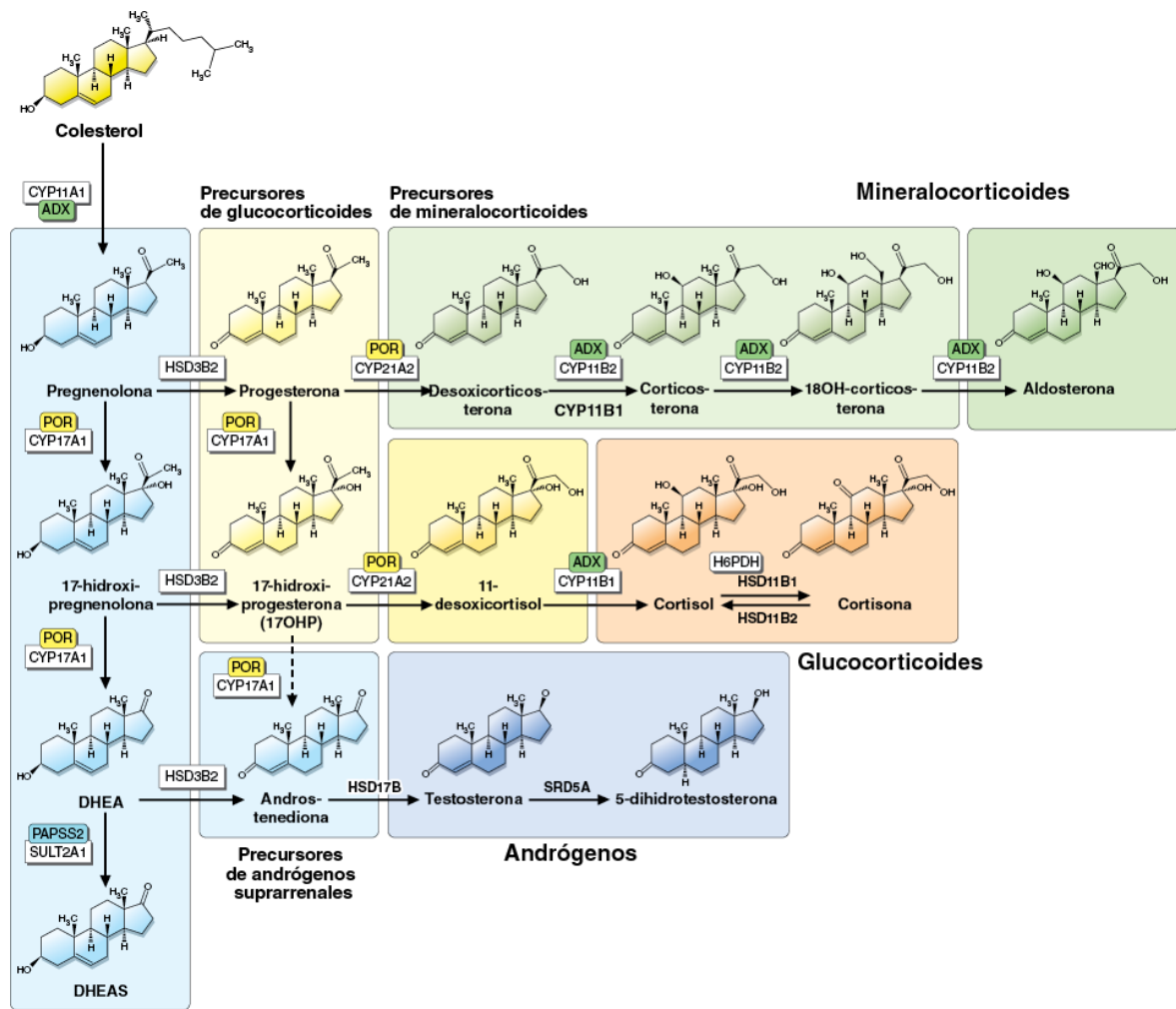


Figura 1.23. Rutas biosintéticas de los corticoesteroides. CYP11A1, enzima de desdoblamiento de la cadena lateral; CYP17A1, 17 α -hidroxilasa/17,20 desmolasa o liasa; POR, P450 oxidorreductasa; ADX, adrenodoxina; HSD3B2, 3 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2; CYP21A2, 21 hidroxilasa; CYP11B1, 11 β -hidroxilasa; CYP11B2, aldosterona sintasa; HSD11B1, 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 1; HSD11B2, 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa tipo 2; H6PDH, hexosa-6-fosfato deshidrogenasa; HSD17B, 17 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa; SRD5A, 5 α -reductasa; SULT2A1, DHEA sulfotransferasa; DHEA, dehidroepiandrosterona; DHEAS, sulfato de dehidroepiandrosterona; PAPSS2, PAPS sintasa tipo 2. Tomada con modificaciones de Kasper *et al.*, 2017.

En la corteza adrenal existen células especializadas en cada una de estas rutas biosintéticas, localizándose en tres zonas anatómicamente distintas: la zona glomerulosa, la zona fasciculada y la zona reticular. La zona glomerular constituye la porción externa de la corteza adrenal. Sus células, se integran funcionalmente en el sistema renina-angiotensina-aldosterona, producen mineralocorticoides en respuesta al incremento de la concentración plasmática de K⁺ o a la disminución del flujo sanguíneo renal (Ehrhart-Bornstein *et al.*, 1998). Además, la DA y el péptido auricular natriurético. La zona fasciculada, localizada en la parte central, es la responsable de la síntesis de GC que está regulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) liberada por la adenohipófisis en respuesta a dos hormonas de origen hipotalámico, la hormona liberadora de

corticotropina (CRH) y la arginina-vasopresina (AVP). Las células de la zona fasciculada forman parte de un sistema neuroendocrino conocido como eje HPA (*Ehrhart-Bornstein et al., 1998*). La ACTH estimula la producción y liberación de GC, que modifican el metabolismo de los distintos principios inmediatos al aumentar la proteólisis, la lipólisis, la gluconeogénesis y disminuir la utilización de la glucosa por las células del músculo esquelético y del tejido adiposo; como consecuencia de estas acciones, los GC incrementan los niveles plasmáticos de glucosa, aminoácidos y triglicéridos. La zona reticular se sitúa en la porción interna de la corteza, entrando en contacto con la región medular. Sus células están especializadas en la síntesis de andrógenos como la testosterona, la dihidrotestosterona, la androstenediona y la deshidroepiandrosterona. Los andrógenos aumentan la masa muscular, estimulan el crecimiento celular y son responsables de la aparición de los caracteres sexuales secundarios masculinos (*Ehrhart-Bornstein et al., 1998*; **Figura 1.24**).

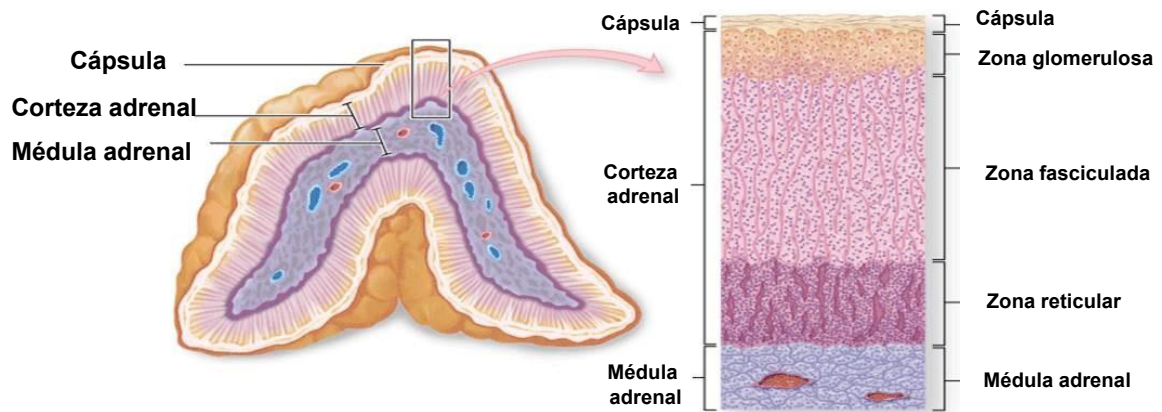


Figura 1.24. La glándula adrenal. En el *panel izquierdo* se observa un esquema de la anatomía macroscópica de la glándula adrenal a partir de un corte sagital de la misma y en el *panel derecho* muestra la estructura en capas de la corteza adrenal. Tomada con modificaciones de *Junqueira y Carneir, 2015*.

Los esteroides corticales actúan sobre las células adrenomedulares para controlar su diferenciación durante el desarrollo embrionario y regular la síntesis y liberación de CAs en el individuo adulto (*Kawata et al., 1994*).

Los GC sintéticos tienen acciones antiinflamatorias e inmunomoduladoras similares a las de los compuestos naturales. Todos ellos atraviesan de forma pasiva la membrana celular para unirse a proteínas receptoras solubles en el citoplasma. El complejo hormona-receptor se desplaza al núcleo y regula la transcripción de una cantidad limitada de genes diana. Un mecanismo de acción adicional de los GC se ha relacionado con la modulación de cascadas de segundos mensajeros a través de receptores de la membrana celular (acciones no genómicas).

Los corticoides son utilizados en muy diversas patologías como las enfermedades

reumáticas (poliarteritis nodosa, polimialgia reumática, lupus eritematoso sistémico, arteritis temporal, etc.), hematológicas (anemia hemolítica autoinmune, púrpura trombocitopénica), oncológicas (leucemia linfocítica, linfomas), digestivas (hepatitis crónica autoinmune, colitis ulcerosa), broncopulmonares (asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica), renales (algunas glomerulonefritis), dermatológicas (pénfigos, dermatitis atópica, etc.) y algunos procesos de base alérgica (Flórez, 2013).

1.3.1.2. La médula adrenal

La médula adrenal está constituida fundamentalmente por las células cromafines que representan la principal fuente de CAs –A y NA – del organismo. Estas células deben su nombre a su afinidad por las sales de cromo que les confieren una coloración amarillo-parduzca al microscopio óptico. Derivan de la cresta neural y tanto anatómica como funcionalmente forman parte del SNS, pudiendo considerarse neuronas ganglionares modificadas (Artalejo, 1995). Las células cromafines sintetizan y almacenan en vesículas secretoras, denominadas gránulos cromafines, grandes cantidades de CAs que liberan al torrente sanguíneo en situaciones de estrés, como las que producen miedo o inducen a la lucha o a la huida (Aunis y Langley, 1999). Las células cromafines presentan una apariencia poligonal en la glándula intacta, pero adoptan la forma de una esfera de 10-15 μm de diámetro cuando se aíslan mediante digestión enzimática. Habitualmente, su núcleo se encuentra localizado excéntricamente, quedando ocupado el resto del citoplasma por 20000-30000 gránulos cromafines con diámetros entre 300 y 400 nm (Burgoyne, 1991; Burgoyne et al., 1993; Plattner et al., 1997).

Las CAs circulantes contribuyen a la respuesta general de adaptación del organismo al estrés, provocando taquicardia, aumento de la presión arterial, broncodilatación y la movilización de las reservas energéticas, entre otros efectos (Carrasco y Van de Kar, 2003). Desde comienzos de los años 50 diversas aproximaciones experimentales han permitido establecer la existencia de al menos dos tipos de células cromafines, adrenérgicas y noradrenérgicas, dependiendo de la CA (A o NA) almacenada y secretada por cada uno de ellos. Inicialmente, gracias a la microscopía de fluorescencia pudo identificarse a las células noradrenérgicas como aquellas que presentan una débil fluorescencia verde en soluciones de formalina (Eranko, 1955). La existencia de dos clases de células cromafines fue confirmada utilizando técnicas de microscopía electrónica en muestras fijadas con soluciones de glutaraldehído/dicromato potásico (Wood y Barrnett, 1964) o de glutaraldehído/tetróxido de osmio (Coupland et al., 1965). En esos trabajos se evidenció que las células adrenérgicas poseen gránulos de forma redondeada y contenido más claro que los gránulos de las células noradrenérgicas, que presentan mayor densidad electrónica debido al precipitado que forma la NA al reaccionar con el glutaraldehído. Posteriormente, diversos estudios inmunocitoquímicos han corroborado la existencia de dos poblaciones distintas de células

cromafines basándose en la presencia o la ausencia de la enzima feniletanolamina N-metiltransferasa (PNMT) (Goldstein *et al.*, 1971). Fenotípicamente, todas las células cromafines son positivas para la dopamina β -hidroxilasa (DBH), presente tanto como elemento estructural de la membrana vesicular y como componente soluble en el interior de la vesícula. Sin embargo, la PNMT sólo se encontraría presente en el citosol de las células adrenérgicas. Las diferencias entre los tipos de células cromafines no quedan restringidas a las CAs almacenadas, habiéndose encontrado también respecto a la localización de algunos péptidos. Los péptidos opioides Leu-encefalina y Met-encefalina (Livett *et al.*, 1981) y la galanina (Rokaeus, 1987) se encuentran preferentemente en las células adrenérgicas, mientras que la dinorfina (Dumont *et al.*, 1983) y la etorfina (Lemaire *et al.*, 1983) lo hacen en las células noradrenérgicas. Más recientemente, resultados obtenidos en células individuales empleando técnicas amperométricas y microcromatográficas han llevado a la descripción de un tercer tipo celular caracterizado por almacenar y segregar cantidades similares de A y NA (Ciolkowsky *et al.*, 1992; Cooper *et al.*, 1994). Las fibras nerviosas predominantes en la médula adrenal son las simpáticas preganglionares (amielínicas y colinérgicas). Estas fibras proceden de los niveles T3-L2 de la médula espinal y a través de los nervios esplácnicos mayor y menor acceden a la médula adrenal donde hacen sinapsis con las células cromafines. Se ha descrito la presencia de dos tipos de vesículas en las terminaciones de las fibras simpáticas preganglionares. Las más numerosas son de pequeño tamaño (10-60 nm de diámetro), claras y de naturaleza colinérgica, y coexistirían con una población minoritaria formada por vesículas de mayor diámetro (25-215 nm) de núcleo electrodenso y que presumiblemente almacenarían neuropéptidos (péptido intestinal vasoactivo (VIP), SP y opioides; Coupland, 1965; Tomlinson y Coupland, 1990). Las fibras preganglionares simpáticas son las principales responsables de la neurotransmisión en la unión esplacno-cromafín. Durante la activación simpática, la ACh liberada por las terminaciones nerviosas del nervio esplácnico se une a receptores nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs) de la membrana de las células cromafines. Como consecuencia de la activación de los nAChRs se produce la despolarización celular y, eventualmente, la descarga de potenciales de acción con la consiguiente entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v . Adicionalmente, neuropéptidos como el VIP o la SP procedentes de estas mismas fibras ejercerían un efecto modulador tanto de la neurotransmisión (a nivel de los nAChRs) como de la respuesta secretora de las células cromafines (regulación de los canales Ca_v). En el seno de la médula adrenal se han identificado neuronas ganglionares simpáticas y/o parasimpáticas encargadas de la regulación del flujo sanguíneo intramedular y con las que harían sinapsis tanto las fibras preganglionares de neuronas cuyos somas se localizan en la médula espinal y/o el núcleo motor del vago (Afework, 1988; Coupland *et al.*, 1989; Parker *et al.*, 1990). La médula adrenal cuenta también con inervación sensitiva a cargo de fibras pertenecientes a neuronas con somas en los ganglios espinales (T9 y T10) y en el núcleo nodoso del vago (Parker *et al.*, 1993). Se trata de

fibras sensibles a capsaicina que almacenan SP, VIP y el péptido hipofisario activador de la adenilato ciclasa (PACAP). Además de transmitir información nociceptiva al SNC, estas fibras pueden actuar como mediadoras de efectos locales como la secreción de CAs o la vasodilatación. La facilidad de cultivo –a partir de la glándula adrenal de mamíferos como la vaca, el gato, la rata, el perro, el cobaya, etc. – y la utilización de técnicas amperométricas (*Chow et al., 1992; Albillos et al., 1997*) y de medida de la capacitancia celular (*Neher y Marty, 1982*) para el estudio de la exocitosis, han convertido a las células cromafines en un modelo ampliamente utilizado en estudios sobre la neurosecreción. Además, la posibilidad de realizar registros electrofisiológicos en rodajas de tejido adrenomedular permite el análisis de la sinapsis esplacno-adrenal y la utilización de esta preparación también como modelo en estudios sobre la neurotransmisión (*Holman et al., 1994; Kajiwarra et al., 1997; Martin et al., 2001*).

1.3.2. Biosíntesis de las catecolaminas

Las CAs son sintetizadas a partir del aminoácido L-tirosina procedente de la dieta o de la hidroxilación de otro aminoácido, la fenilalanina. La primera etapa en la ruta biosintética consiste en la conversión de la tirosina en dihidroxifenilalanina (DOPA), con la participación de la TH, una enzima citosólica (*Kaufman, 1995; Flatmark, 2000*). Existen múltiples mecanismos de regulación de la actividad de la TH actuando en distintas escalas de tiempo. La actividad de esta enzima está instantáneamente –segundos-minutos– regulada por la disponibilidad de tetrahidrobiopterina, que actúa como cofactor en la reacción de hidroxilación, y de los distintos productos de la ruta biosintética (DOPA, NA y A), que mediante la inhibición de la enzima operan como sistema de retroalimentación negativa. También en la escala de los minutos se establece la regulación de la TH por diversas cinasas (PKA, PKC, proteína cinasa G, PKG; proteína cinasas reguladas extracelularmente 1 y 2, ERK 1/2 y CaMKII) capaces de modular alostéricamente su actividad mediante la fosforilación de diversas serinas situadas en el extremo N-terminal (*Nagatsu, 1995; Kumer y Vrana, 1996; Dunkley et al., 2004*). En una escala de tiempo mayor –horas– la actividad de la enzima se regula a nivel transcripcional, lo cual incluye cambios en la velocidad de síntesis del ARNm de diversas isoformas generadas por ajuste (*splicing*) alternativo. De hecho, la modificación de la expresión del gen de la TH constituye un mecanismo fundamental de la respuesta del sistema catecolaminérgico al estrés. La DOPA se convierte en DA con el concurso de la L-aminoácido-aromático descarboxilasa (LAAD), una enzima con escasa especificidad de sustrato cuya actividad se regula por la disponibilidad de su cofactor, el piridoxal fosfato. La DA se incorpora desde el citosol al interior de vesículas de secreción en las que es convertida en NA por la DBH, enzima que se encuentra tanto en la membrana como en la fracción soluble de las vesículas. La fracción soluble es liberada durante la exocitosis, lo que explica la detección de esta enzima en el plasma y en el líquido cefalorraquídeo (*Weinshilboum y Axelrod, 1971*). Finalmente,

la NA es transformada en A, mediante la metilación del grupo amino, por la enzima citosólica PNMT (**Figura 1.25**).

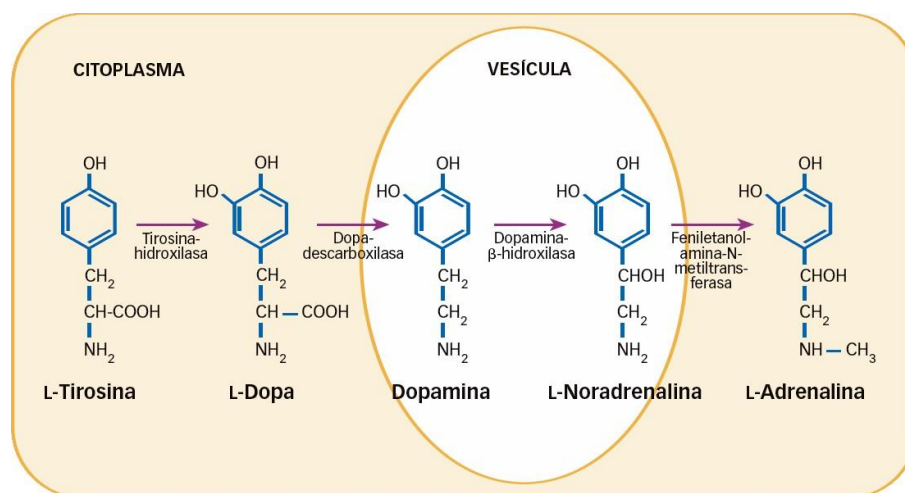


Figura 1.25. Ruta biosintética de las CAs. Los pasos de la conversión de L-tirosina a L-noradrenalina son típicos del sistema simpático y algunas neuronas cerebrales, mientras que la conversión de L-noradrenalina en L-adrenalina es típica de las células cromafines de la médula adrenal y algunas neuronas periféricas y cerebrales. Tomada de *López et al., 2008*.

Esta enzima se localiza predominantemente en la médula adrenal, en algunos órganos y tejidos no neuronales inervados por el sistema nervioso simpático (corazón, piel, músculo esquelético, etc.) y en un número restringido de neuronas del SNC como las neuronas adrenérgicas del bulbo raquídeo implicadas en la patogénesis de la hipertensión arterial (*Kvetnansky et al., 1971; Kennedy et al., 1993; Huang et al., 1996; Ziegler et al., 1998; Huang et al., 2005; Pullar et al., 2006; Grandbois et al., 2016*). La actividad de la PNMT se regula tanto por mecanismos humorales (eje HPA) como neurales (actividad del nervio esplácnico). El eje HPA actúa a través de los GC que, secretados en situaciones de estrés, se unen al promotor del elemento de respuesta de GC (GRE) y activan la transcripción del gen de la PNMT. La regulación neural de la expresión de la PNMT está mediada por la ACh y el PACAP liberado por las terminaciones del nervio esplácnico sobre las células cromafines que activan factores de transcripción como Egr-1 (*early grown response protein-1*) y Sp1 (*specificity protein-1*) modifican cascadas de señalización en las que participan distintas cinasas de proteínas (PKA, PKC y MAPK) que son capaces de modificar de una forma independiente la actividad de la PNMT (*Grandbois et al., 2016*). La PNMT es inhibida competitivamente y de forma selectiva por fármacos como el SKF6139, que actúa tanto a nivel periférico como central (*Giovambattista et al., 2000*). Estos fármacos producen cambios en el contenido de las vesículas catecolaminérgicas consistentes en la acumulación de NA, a expensas de la A. Otros inhibidores de la PNMT como el SKF29661 ven limitada su actuación en el SNC, ejerciendo efectos exclusivamente periféricos (*Pendleton et al., 1988*).

1.3.3. Propiedades eléctricas de las células cromafines

1.3.3.1. Propiedades pasivas de la membrana

Las propiedades eléctricas pasivas de la membrana de las células cromafines fueron descritas por primera vez empleando la técnica de *patch-clamp*. En células bovinas aisladas estimaron que la resistencia de entrada era de al menos 5 G Ω y la constante de tiempo de la membrana, calculada a partir de la respuesta de voltaje inducida por pulsos de corriente, de \approx 50 ms; esta constante de tiempo está relacionada con una capacitancia de la membrana celular comprendida entre 4 y 10 pF. Considerando que las células cromafines tienen forma esférica y diámetros entre 10 y 15 μ m, el cociente entre la superficie de la célula y su capacitancia permite estimar una capacitancia específica de la membrana de 1,08 μ F/cm². La resistencia de entrada y la constante de tiempo de la membrana de las células cromafines aisladas, medidas con la técnica de *patch-clamp* presentan valores superiores a los estimados mediante el empleo de microelectrodos intracelulares en cortes de la glándula adrenal de distintas especies (ratón, cobaya; *Holman et al.*, 1994; *Nassar-Gentina et al.*, 1988). Estas diferencias pueden ser atribuidas al daño causado por los microelectrodos en la membrana, que originaría una corriente de fuga con la consiguiente disminución en la resistencia de la membrana, así como a la existencia de acoplamiento eléctrico entre las células cromafines *in situ* (*Nassar-Gentina et al.*, 1988; *Moser*, 1998; *Martin et al.*, 2001).

1.3.3.2. El potencial de membrana en reposo

El potencial de membrana en “reposo” (V_r) de las células cromafines se sitúa entre -50 y -80 mV (*Artalejo*, 1995). En el establecimiento del V_r de las células cromafines parece clara la contribución de las conductancias de la membrana al K⁺, dado que el V_r varía linealmente con el logaritmo de la concentración extracelular de K⁺ y que la ecuación de Goldmann-Hodgkin-Katz establece una relación de permeabilidades de la membrana al Na⁺ y al K⁺ de 0,07 (*Douglas et al.*, 1967). Otra evidencia que implica a los canales de K⁺ en el control del V_r estriba en el efecto despolarizante del Ba²⁺ (1 mM) y del tetrametilamonio (TEA; 30 mM), dos bloqueantes no selectivos de este tipo de canales (*Marty y Neher*, 1985; *Nassar-Gentina et al.*, 1988; *González García et al.*, 1993; *von Ruden et al.*, 1993). La identidad de los canales iónicos involucrados en el control del V_r permanece aun relativamente desconocida, aunque existen datos que apuntan a los canales de K⁺ rectificadores de entrada (*Akaike et al.*, 1990^a; 1990^b; *Inoue y Imanaga*, 1993), a los canales de K⁺ tipo ERG (*Chiesa et al.*, 1997), los canales de K⁺ responsables de la corriente de tipo M (*Wallace et al.*, 2002) y a los canales de K⁺ tipo TASK (*Inoue et al.*, 2012). Por último, cabe mencionar que los canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺ y pequeña conductancia (SK), los canales catiónicos dependientes de Ca²⁺ y los canales de Ca_v de los tipos T y L podrían también regular la excitabilidad celular en situaciones en las que la célula se encuentre ligeramente despolarizada o la concentración intracelular de Ca²⁺ ([Ca²⁺]_i) se halle mínimamente elevada (200-300 nM; *Fenwick*

et al., 1982a; Neely y Lingle, 1992; Artalejo *et al.*, 1993; Marcantoni *et al.*, 2007).

1.3.3.3. Generación del potencial de acción

Las células cromafines de rata descargan espontáneamente potenciales de acción (Brandt *et al.*, 1976; Akaike *et al.*, 1990a; Hollins e Ikeda, 1996). El potencial de acción de las células cromafines muestra algunas características similares a las de los potenciales de acción de los axones, que son generados por la apertura de canales de Na_v . Así, presentan una fase de rápida despolarización (pendiente máxima de 50 V/s), alcanzan valores de potencial muy despolarizados ($\geq +30$ mV) y muestran pronunciadas posthiperpolarizaciones (AHPs; Ishikawa y Kanno, 1978; Fenwick *et al.*, 1982a; Hollins y Ikeda, 1996). Las propiedades de los canales Na_v de las células cromafines son similares a las de los canales descritos por Hodgkin y Huxley en el axón gigante del calamar (Hodgkin y Huxley, 1952; Hodgkin *et al.*, 1952). La corriente macroscópica de Na^+ comienza a activarse alrededor de -30 mV y alcanza la máxima amplitud a +10 mV. El potencial de semi-inactivación (V_{50}) en estado estacionario de los canales Na_v es de -35 mV. Los registros de canal único revela una corriente elemental de 1 pA a -10 mV (150 mM de Na^+ extracelular y 10 mM de Na^+ intracelular) que se incrementa con la hiperpolarización entre -10 y -40 mV. El tiempo medio de apertura de los canales es de 1 ms a -30 mV y disminuye tanto con la despolarización como con la hiperpolarización de la membrana. Así mismo, el análisis del ruido de las fluctuaciones de la corriente macroscópica de Na^+ debidas a las aperturas y cierres estocásticos de los canales ofrece valores consistentes con las mediciones de las corrientes unitarias, lo que sugiere la existencia de poblaciones homogéneas de canales Na_v desde un punto de vista biofísico de un solo tipo de canal Na_v en las células cromafines. El cociente entre la amplitud máxima de la corriente macroscópica (rango de 150 a 1000 pA) y la corriente unitaria, permite estimar una densidad de canales Na_v en la membrana de las células cromafines bovinas de 1,5 a 10 canales por μm^2 (Artalejo, 1995).

1.3.3.4. Canales iónicos de las células cromafines

1.3.3.4.1. Canales de Na^+

Entre los canales Na_v presentes en las células cromafines de la médula adrenal de la rata, cabe destacar una isoforma en particular, la Na_v 1.7 (Klugbauer *et al.*, 1995; Catterall *et al.*, 2002; Catterall *et al.*, 2005). La corriente generada a través de la isoforma Na_v 1.7 se caracteriza por una activación que se inicia alrededor de -30 mV hasta alcanzar su máxima amplitud a +10 mV, con un potencial de activación 50% (V_{50}) en el rango de -20 a -8 mV (Wada *et al.*, 2008). Otras propiedades biofísicas de la isoforma Na_v 1.7 son una constante de tiempo de inactivación de 155 ms, que permite la generación de potenciales de acción durante despolarizaciones lentas y de larga duración, y una constante de tiempo de recuperación de la inactivación de 72 ms (Herzog *et al.*,

2003; Vandael et al., 2015) que condiciona la descarga de potenciales de acción a baja frecuencia – periodo refractario largo–, característica de las células cromafines. Sin embargo, la eliminación del Na^+ del medio extracelular y la adición de TTX, no impide la generación de potenciales de acción por las células cromafines, siendo necesario eliminar tanto el Na^+ como el Ca^{2+} para anular la probabilidad de disparo (Kidokoro y Ritchie, 1980; Nassar-Gentina et al., 1988).

Estudios de PCR, inmunotransferencia y electrofisiológicos han identificado también la isoforma $\text{Na}_v 1.3$ en las células cromafines de ratón, cuya inactivación parcial se asocia a la existencia de ráfagas de potenciales de acción de mínima amplitud, capaces no obstante, de facilitar una liberación sustancial de CAs (Vandael et al., 2015).

1.3.3.4.2. Canales de Ca^{2+}

Las células cromafines expresan diversos tipos de canales Ca_v (García et al., 2006). La corriente macroscópica de Ca^{2+} se activa a potenciales positivos a -30 mV, alcanza un pico alrededor de +10 mV y revierte a partir de +60 mV (Fenwick et al., 1982b).

Estos canales pueden dividirse, desde un punto de vista biofísico, en dos grandes grupos en función del voltaje requerido para su apertura: los canales de bajo umbral de activación (LVA; *low voltage-activated*), que se abren a potenciales por encima de -50 mV, y los canales de alto umbral de activación (HVA, *high voltage-activated*), que requieren una fuerte despolarización de la membrana para abrirse (por encima de -30 mV; Carbone y Lux, 1984; Nowycky et al., 1985; Fox et al., 1987).

Los canales LVA o de tipo T en células cromafines de rata, se caracterizan por activarse tras ligeras despolarizaciones de la célula y por una rápida cinética de inactivación. Actuarían disminuyendo el umbral de generación de los potenciales de acción (Hollins e Ikeda, 1996; Novara et al., 2004; Carabelli et al., 2007). Estos canales alcanzan relevancia en situaciones de estrés, en donde las células cromafines se encuentran despolarizadas durante largos periodos de tiempo o disparan potenciales de acción a frecuencias moderadamente elevadas (15-20 Hz).

Con respecto a los canales HVA, se han descrito hasta cinco subtipos, que se diferencian entre sí por sus propiedades biofísicas y farmacológicas: los subtipos L, N, P/Q y R (Albillos et al., 1994; Artalejo et al., 1994; López et al., 1994; Albillos et al., 1996a). En la célula cromafin presentan una densidad relativa muy diferente entre especies (García et al., 2006) siendo los de tipo L los más abundantes en rata, ratón y gato mientras que los de subtipo P/Q predominarían en humanos. Los canales de tipo L estarían formados por la subunidad $\alpha 1D$ cumpliendo un papel relevante en el control de la frecuencia de disparo (función de marcapasos) de los potenciales de acción en las células cromafines al controlar la activación de los canales de K_v dependientes de Ca^{2+} responsables de la AHP (Marcantoni et al., 2007; Albiñana et al., 2015).

1.3.3.4.3. Canales de K⁺

a) Dependientes de voltaje

Los canales de K⁺ en las células cromafines se pueden clasificar en función de la dependencia de voltaje, de Ca²⁺ y de su tipo de su rectificación. Así pues, existen canales K_v, dependientes de Ca²⁺, dependientes de Ca²⁺ y voltaje y, por último, canales rectificadores de entrada. Marty y Neher (1985) describieron dos tipos de canales K_v, que denominaron FK y SK (*fast-K* y *slow-K*) debido a que el primero presentaba cinéticas de activación e inactivación más rápidas que el segundo. En registros de canal único, el canal FK presenta una conductancia unitaria de 18 pS (140 mM KCl intracelular y 140 mM NaCl extracelular), actividad en forma de ráfagas y probabilidad de apertura máxima entre +20 y +40 mV. El canal FK se inactiva de forma dependiente de voltaje con una constante de tiempo del orden de las decenas de ms. El canal SK también presenta actividad en ráfagas y posee una conductancia unitaria de 8 pS en las condiciones iónicas referidas para el canal FK. Este canal también diferiría del FK por generar una corriente macroscópica con una constante de tiempo de inactivación de ≈ 40 ms, independientemente del potencial de membrana y por su marcada resistencia al TEA (40 mM). También en células cromafines bovinas, Sala *et al.* (1991) aislaron una corriente de K⁺ con rectificación de salida al despolarizar desde -60 mV en presencia de 0,5 mM de CdCl₂ extracelular y altas concentraciones citosólicas (11 mM) de EGTA para evitar la activación de canales de K⁺ dependientes de Ca²⁺. Esta corriente se activa lentamente (el canal responsable sería un rectificador de salida normal tardío) y experimenta una inactivación muy lenta y dependiente de voltaje (V_{50} de -40 mV). Dado que la inactivación en el estado estacionario de esta corriente aumentaba al incrementar la frecuencia o la duración de los pulsos despolarizantes, propusieron que los canales de K⁺ responsables de la misma podrían contribuir al ensanchamiento de los potenciales de acción y, por tanto, al incremento de la entrada de Ca²⁺ durante estimulaciones repetitivas. Se ha referido también la existencia de canales de K⁺ rectificadores de salida responsables de la generación de corrientes de tipo M en las células cromafines bovinas (Wallace *et al.*, 2002). Las corrientes de K⁺ de tipo M son dependientes de voltaje (se activan al despolarizar con V_{50} de ≈ -40 mV), no inactivantes y de muy lenta deactivación. Característicamente, los canales de tipo M están activados al V_r de la membrana y contribuyen al mismo. Neurotransmisores como la ACh y distintos neuromoduladores inhiben los canales de tipo M ocasionando la despolarización celular y, eventualmente, el disparo de potenciales de acción. Otro canal de K⁺ rectificador de salida descrito en las células cromafines de rata y cobaya es el TAK1 (TWIK-related acid sensitive K⁺; Inoue *et al.*, 2012). Este canal se bloquea por la acidificación del medio extracelular y la activación de los mAChRs. Entre los canales de K⁺ con rectificación de entrada (Akaike *et al.*, 1990b), el de tipo ERG ha sido el mejor caracterizado. Los canales ERG están abiertos al potencial de reposo y se inactivan con la

despolarización. Además, su activación es lenta y progresa a lo largo de los trenes de potenciales de acción contribuyendo, por tanto, al proceso de acomodación de la frecuencia de disparo durante dichos trenes. Existen evidencias funcionales, inmunocitoquímicas y de biología molecular a favor de la expresión de los canales ERG en las células cromafines de tipo adrenérgico de la rata (*Gullo et al.*, 2003).

b) Dependientes de Ca^{2+}

Los canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} comprenden dos tipos de canales diferenciados por su conductancia iónica y mecanismo de activación: los canales de pequeña conductancia (SK) y los canales de elevada conductancia iónica (BK). Los canales SK constituyen la única familia (SK1 al SK4) de canales selectivos para K^+ que se activan exclusivamente por el incremento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ (*Maylie et al.*, 2004). Los canales SK de las células cromafines poseen una conductancia unitaria de 3-5 pS (a concentraciones de K^+ fisiológicas), presentan una mínima sensibilidad a los cambios de voltaje y son bloqueados por apamina y d-tubocurarina. Dada su sensibilidad al Ca^{2+} y su independencia del voltaje, los canales SK juegan un papel importante cuando se eleva la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ de las células cromafines en ausencia de despolarización o cuando ésta es de unos pocos mV (p. ej., durante los *excitatory postsynaptic potentials*, EPSPs). La primera circunstancia se produce tras la administración de sustancias que incrementan la síntesis de inositol trifosfato (IP3), como la muscarina (en la rata), la metacolina (en el gato) y la histamina (en la vaca; *Horn y Marty*, 1988; *Eberhard y Holz*, 1991; *Neely y Lingle*, 1992; *Uceda et al.*, 1992; *Artalejo et al.*, 1993). La consecuencia inmediata de la activación de los canales SK es una hiperpolarización transitoria y, en su caso, la reducción de la duración de los EPSPs; y además los canales SK se activan por la entrada de Ca^{2+} que tiene lugar durante los potenciales de acción generando una AHP de larga duración cuyo aumento progresivo durante la descarga repetida de los mismos determina la disminución paulatina de la frecuencia de disparo (adaptación). Las células cromafines de todas las especies investigadas presentan canales BK sensibles a caribdotoxina, iberiotoxina y paxilina que se activan durante la despolarización y la entrada de Ca^{2+} que acompaña a los potenciales de acción (*Pancrazio et al.*, 1994). Son los principales responsables de la repolarización de los mismos y de la AHP rápida que los sigue. Debe señalarse que en las células cromafines de rata se ha descrito la existencia de una variante de los canales BK caracterizada por presentar inactivación dependiente de Ca^{2+} intracelular y por generar AHPs de larga duración (*Solaro y Lingle*, 1992). Esta circunstancia determina que en aquellas células en las que predomine esta variante, la fisonomía de los trenes de potenciales de acción y el fenómeno de adaptación de frecuencia dependa también de la actividad de este tipo de canales (*Solaro et al.*, 1995).

1.3.3.5. Los nAChRs de las células cromafines

En las células cromafines de la rata se expresan la totalidad de las subunidades formadoras

de nAChRs neuronales: $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$, $\alpha 7$, $\alpha 9$, $\alpha 10$, $\beta 2$, $\beta 3$ y $\beta 4$ (Mousavi *et al.*, 2001; Di Angelantonio *et al.*, 2003; Colomer *et al.*, 2010; Pérez-Álvarez *et al.*, 2012a; 2012b; Bustillo, 2015). Dichas subunidades se asociarían para constituir muy diversos nAChRs con estructura pentamérica. Desde el punto de vista biofísico, los nAChRs de las células cromafines presentan una conductancia unitaria a potenciales de membrana negativos (desde -40 hasta -120 mV) de 30 pS (Kidokoro, 1983; Inoue y Kuriyama, 1991) y exhiben tiempos medios de apertura prolongados (15-30 ms; Fenwick *et al.*, 1982b; Kidokoro, 1983; Inoue y Kuriyama, 1991).

El hallazgo en las células cromafines de nAChRs con alta permeabilidad al Ca^{2+} formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$; (Fuentealba *et al.*, 2004; Fucile *et al.*, 2006) ha añadido complejidad al mecanismo de señalización nicotínica al posibilitar un efecto dual, despolarizante e hiperpolarizante. La activación de los nAChRs induce un aumento de la $[\text{Ca}^{2+}]_i$ en la que participarían tres mecanismos: i) entrada de Ca^{2+} a través del nAChR, ii) entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v activados por la despolarización y, iii) movilización de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares. La contribución relativa de estos mecanismos varía con el tipo de nAChR. Así para los nAChRs de tipo $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 9\alpha 10$ posibilitarían la entrada de Ca^{2+} directamente a su través – independientemente de la activación de los canales Ca_v – la cual además, puede activar la liberación de Ca^{2+} desde depósitos intracelulares tanto sensibles a rianodina –mecanismo de tipo liberación de Ca^{2+} inducida por Ca^{2+} (CICR; *calcium induced calcium release*) – como sensibles a IP_3 (Eberhard y Holz, 1987; 1991; Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004; Wu *et al.*, 2010).

Cabe señalar que la subunidad $\alpha 7$ se expresaría predominantemente en las células adrenérgicas bajo la influencia de los corticoides de la corteza suprarrenal que, vía el factor de transcripción Egr-1, activan coordinadamente la transcripción de los genes que codifican la PNMT y la subunidad $\alpha 7$ de los nAChRs (Criado *et al.*, 1997; Carrasco-Serrano y Criado, 2004). El nAChR mayoritario de las células cromafines de rata es el de tipo ganglionar, formado por las subunidades $\alpha 3$ y $\beta 4$, a las que también podrían asociarse, para constituir heterómeros más complejos, las subunidades $\alpha 5$, $\alpha 6$ y/o $\beta 2$. Este nAChR sería el responsable principal de los cambios observados en el potencial de membrana y, consiguientemente, en la respuesta secretora inducida por la ACh en las células cromafines (Nooney *et al.*, 1992; Barbara y Takeda, 1996; Kajiwara *et al.*, 1997; Wenger *et al.*, 1997; Tachikawa *et al.*, 2001; Yokotani *et al.*, 2002; Di Angelantonio *et al.*, 2003; Martin *et al.*, 2003; Free *et al.*, 2005; Pérez-Álvarez *et al.*, 2012a; Hone *et al.*, 2015). Así mismo, cabe pensar en la existencia con carácter minoritario de nAChRs parcial o totalmente formados por las subunidades $\alpha 7$, $\alpha 9$ y $\alpha 10$, que también podrían contribuir a la respuesta secretora de CAs (López *et al.*, 1998; Maneu *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2003; Colomer *et al.*, 2010; Bustillo, 2015).

Los nAChRs homoméricos $\alpha 9$ y los heteroméricos $\alpha 9\alpha 10$ presentan una farmacología

peculiar entre los nAChRs, ya que, además de ser activados por el agonista muscarínico Oxotremorina-M, son los únicos nAChRs inhibidos por la nicotina; así mismo, pueden ser bloqueados por sustancias tan diversas como la muscarina ($CI_{50}(\alpha 9)$ de 75 μM ; $CI_{50}(\alpha 9\alpha 10)$: 41 μM), la atropina ($CI_{50}(\alpha 9/\alpha 9\alpha 10)$ de 1 μM), la α -BgTx (de forma reversible $CI_{50}(\alpha 9)$ de 2,1 nM; $CI_{50}(\alpha 9\alpha 10)$ de 14 nM), y la α -RgIA ($CI_{50}(\alpha 9/\alpha 9\alpha 10)$ de 5 nM) entre otras (Elgoyhen et al., 1994; Verbitsky et al., 2000; Elgoyhen et al., 2001; Sgard et al., 2002; Rothlin et al., 2003; Ellison et al., 2006).

En el año 2006 el grupo de Michael McIntosh (Universidad de Utah) revolucionó la farmacología de los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ mediante el descubrimiento de la α -RgIA (Ellison et al., 2006). Se trata de un péptido de 13 aminoácidos, sintetizado por el caracol *Conus regius*, que presenta una extraordinaria potencia y selectividad para bloquear las respuestas mediadas por los nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ de rata tanto recombinantes (expresados en ovocitos) como nativos (células del epitelio sensitivo de la cóclea). El hecho de que la administración de la α -RgIA y de la α -conotoxina Vc1.1 (ACV1), otro antagonista de los nAChRs $\alpha 9^*$, produzca analgesia en modelos animales de dolor neuropático (CCI) e inflamatorio (inyección podal de formalina), llevó hace algunos años a sugerir la participación de los nAChRs $\alpha 9^*$ en la fisiopatología de la sensación dolorosa y a intentar validarlos como diana de nuevos fármacos analgésicos (Satkunanathan et al., 2005; Vincler et al., 2006; Vincler y McIntosh, 2007; McIntosh et al., 2009). Éste último aspecto ha sido objeto de controversia a raíz de los estudios del grupo de David Adams en la Universidad de Queensland (Callaghan et al., 2008; Klimis et al., 2011). Dichos estudios daban fe de la capacidad de ambas toxinas para comportarse como agonistas de los receptores GABA_B, presentes en las neuronas DRG, y, consiguientemente, inhibir los canales de Ca^{2+} de tipo N. Esta controversia ha sido en buena medida superada gracias a la obtención de antagonistas no peptídicos de los nAChRs $\alpha 9^*$, como el derivado azaromático cuaternario ZZ204G, que reproducen el efecto analgésico de los antagonistas peptídicos al tiempo que carecen de afinidad por el receptor GABA_B (Holtman et al., 2011; Zheng et al., 2011). El mecanismo de la acción analgésica de estos compuestos es insuficientemente conocido. En el modelo CCI, realizado con hilo crómico comporta una reacción inflamatoria local dependiente, entre otros factores, de la acumulación de linfocitos que expresan colina acetilasa y, por ello, constituyen una fuente local de ACh que activaría los nAChRs $\alpha 9^*$ presentes en diversas poblaciones linfocitarias (Peng et al., 2004). La α -RgIA y la ACV1 reducen significativamente el número de linfocitos y macrófagos en el área de la lesión nerviosa, por lo que su acción analgésica ha sido atribuida a un efecto inmunomodulador. Esta circunstancia y el hecho que la subunidad $\alpha 9$ se exprese en neuronas DRG, plantean la posibilidad de que los antagonistas de los nAChRs $\alpha 9^*$ puedan producir su acción analgésica actuando también sobre las terminaciones y/o el soma de estas neuronas (Lips et al., 2002).

En situaciones de estrés crónico la caracterización farmacológica de los nAChRs de las células cromafines de la medula adrenal mediante: i) la utilización de diversos agonistas nicotínicos (ACh, nicotina, oxotremorina-M) con perfiles farmacológicos diferenciados a concentraciones próximas a sus CE_{50} en nuestro modelo experimental (*Olivos-Oré, 2009*); ii) el empleo de agonistas y moduladores específicos de determinados tipos de nAChRs; iii) la valoración del efecto de concentraciones máximas de antagonistas selectivos de distintos tipos de nAChRs sobre las respuestas inducidas por dichos agonistas; y iv) la administración simultánea o consecutiva de fármacos antagonistas con afinidad por diferentes subunidades formadoras de nAChRs heteroméricos permitió estimar la expresión relativa (haciendo abstracción de sus conductancias unitarias) de los distintos tipos de nAChRs en términos de su contribución a la corriente inducida por la ACh. Los resultados obtenidos en nuestro grupo de investigación pudo concluir que en los animales estresados crónicamente (por frío) se produce un aumento de la expresión de nAChRs $\alpha 7$ homoméricos, nAChRs $\alpha 9\alpha 10$ y de los nAChRs $\alpha 7\alpha 9/\alpha 10$ (*Bustillo, 2015*).

1.3.3.6. Acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines

El papel del Ca^{2+} en el proceso de acoplamiento excitación-secreción de las células cromafines se describió hace ya más de 50 años (*Douglas y Rubin, 1961a; 1961b*). La activación de los nAChRs por la ACh liberada por el nervio esplácnico induce cambios en el potencial de membrana así como modificaciones –tanto de forma directa como indirecta– en la $[Ca^{2+}]_i$. Si bien los primeros suelen ser de breve duración, los segundos pueden dar lugar a respuestas relativamente prolongadas en el tiempo (*Dajas-Bailador y Wonnacott, 2004*). Clásicamente, se viene aceptando que la ACh originaría una respuesta despolarizante rápida dependiente de la activación de los nAChRs (EPSP), con el consiguiente disparo de potenciales de acción debidos a la activación de canales Na_v y Ca_v . A cada potencial de acción le sigue una fase de AHP relacionada con el aumento de la conductancia de K^+ activada por el incremento del Ca^{2+} citosólico dependiente tanto de la movilización de los depósitos intracelulares de este catión por la estimulación muscarínica como de su entrada a través de canales Ca_v activados durante la fase de despolarización del potencial de acción (*Olivos-Oré y Artalejo, 2008*). El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ no solo induce los cambios en el potencial de membrana que acabamos de referir sino que también actúa como desencadenante de la exocitosis de las CAs (*Ceña et al., 1983; Figura 1.26*). La exocitosis implica la fusión de la membrana de la vesícula de secreción (gránulo cromafín) con la membrana plasmática y el establecimiento de una solución de continuidad entre el interior vesicular y el espacio intersticial (*Parsons et al., 1995*). Dado que en el interior de las vesículas se almacenan diversos mensajeros químicos (CAs, ATP, opioides, etc.) a elevadas concentraciones, la exocitosis permite la liberación sincronizada de una gran cantidad de moléculas de los mismos.

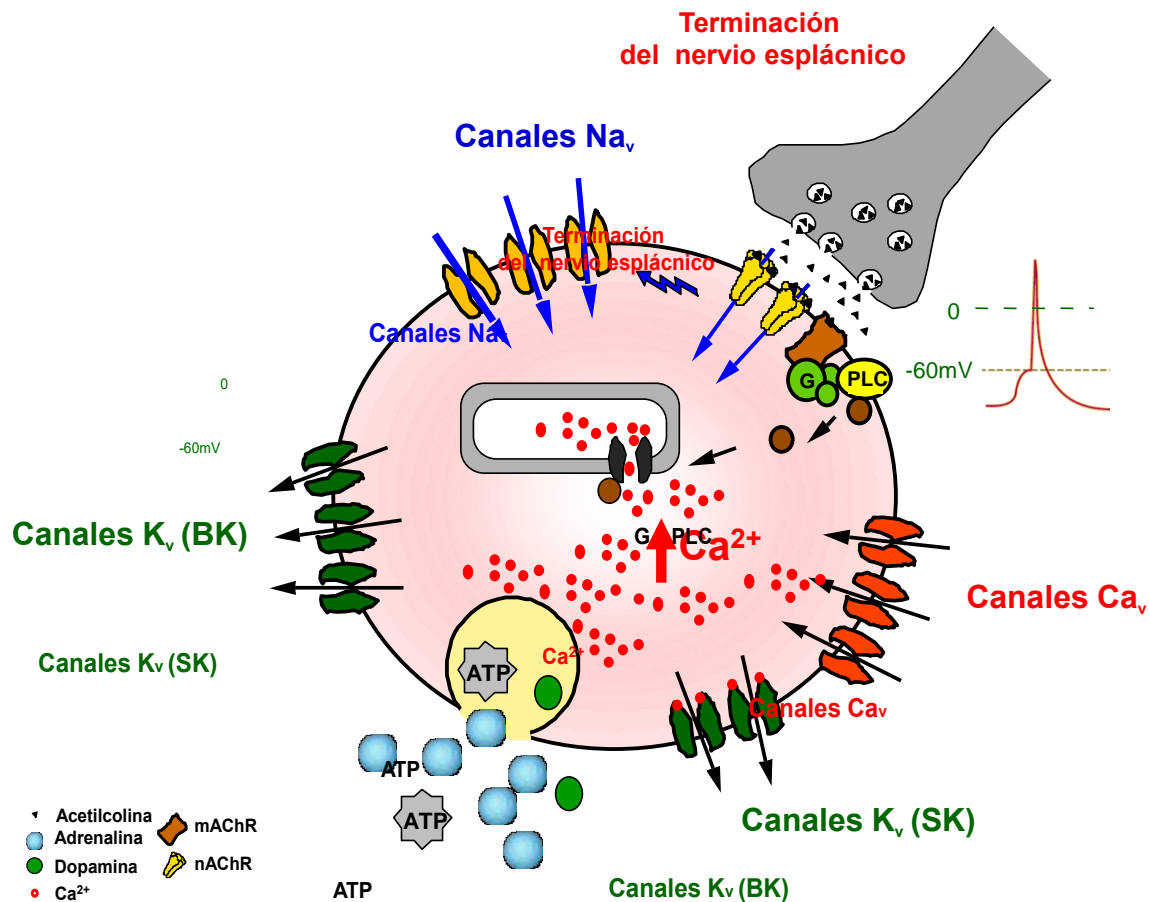


Figura 1.26. Acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines. La ACh liberada por las terminaciones del nervio esplácnico se une a los receptores nicotínicos (nAChRs) y muscarínicos (mAChRs) de la membrana de la célula cromafín originando una despolarización que provoca la apertura de canales voltaje dependientes (Na_v , Ca_v y K_v) responsables del disparo de potenciales de acción. La entrada de Ca^{2+} a través de los canales Ca_v y la liberación desde depósitos intracelulares sensibles a IP_3 , sintetizado por la fosfolipasa C (PLC) como consecuencia de la estimulación de mAChRs, conduce al aumento de la concentración citosólica de Ca^{2+} ($[Ca^{2+}]_i$). El incremento de la $[Ca^{2+}]_i$ desencadena la liberación exocitótica del contenido de los gránulos cromafines y promueve la hiperpolarización de la membrana celular vía activación de canales de K^+ dependientes de Ca^{2+} (BK y SK). Tomada con modificaciones de *Olivos y Artalejo, 2008*.

1.4. Los receptores adrenérgicos

Los receptores adrenérgicos comprenden dos grandes clases o tipos, α y β , y cada clase a su vez incluye varios subtipos: $\alpha 1A$, $\alpha 1B$, $\alpha 1D$, $\alpha 2A$, $\alpha 2B$, $\alpha 2C$, $\beta 1$, $\beta 2$ y $\beta 3$ (*Ahlquist, 1948; Bylund et al., 1994*). Todos los receptores adrenérgicos pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos están acoplados a la proteína Gq que mediante la activación de la PLC generan como segundos mensajeros IP_3 y diacilglicerol (DAG) que, respectivamente, liberan Ca^{2+} de los depósitos intracelulares y activan la PKC; por su parte, los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos actúan a través de la proteína Gi que pone en marcha varias vías de señalización incluyendo la inhibición de la AC (lo cual reduce los niveles de AMPc), la activación de los canales de K^+ rectificadores de entrada (lo cual se asocia a la hiperpolarización de la membrana celular) y la inhibición de los canales de Ca_v (*Hoffman y Williams, 2012*). Los

adrenoceptores β activan la AC vía la proteína Gs.

La distribución de los receptores adrenérgicos es ubicua, encontrándose en la práctica totalidad de los territorios orgánicos, respondiendo no solo a la NA liberada sinápticamente (neuronas del SNC y uniones neuroefectoras del SNS) sino también a la A liberada por las células cromafines de la médula adrenal al torrente sanguíneo. Sus acciones vienen condicionadas por su localización como se muestra en la **Tabla 1.2**.

Tabla 1.2. Distribución y efectos de la activación de los distintos tipos de receptores α y β adrenérgicos. Nodo SA: Nodo sinoauricular; AV: auriculoventricular.

Localización		Receptor	Respuesta a la activación	
Músculo liso	Vasos sanguíneos	$\alpha 1$	Contracción	
		$\alpha 2$	Contracción/Relajación (efecto presináptico)	
		$\beta 2$	Relajación	
	Bronquios	$\alpha 1$	Reducción secreciones, contracción	
		$\beta 2$	Relajación	
	Útero	$\alpha 1$	Contracción	El predominio depende de la fase del ciclo ovárico/gestación
		$\beta 2$	Relajación	
	Aparato digestivo	$\alpha 1$	Reduce la motilidad, contracción de esfínteres	
		$\alpha 2$	Disminución de secreciones/reducción motilidad (efecto presináptico)	
$\beta 2$		Relajación		
Corazón	Nodo SA, AV, aurículas y ventrículos	$\beta 1$	Efecto inotrópico (fuerza) y cronotrópico (ritmo) positivos	
Ojo	Músculo radial (iris)	$\alpha 1$	Contracción (midriasis)	
	Músculo ciliar	$\beta 2$	Relajación	
	Cuerpo ciliar	$\beta 1$	Aumento de la secreción de humor acuoso	
Músculo esquelético		$\beta 2$	Aumento masa muscular, glucogenolisis, temblor, termogénesis	
Tejido adiposo		$\beta 3$	Lipolisis, termogénesis	
Otros		$\alpha 1$	Disminución de secreción nasal y bronquial, hígado (glucogenolisis), aumento sudoración (diaforesis), contracción esf. vesical, efecto trófico sobre músculo liso vascular y prostático	
		$\alpha 2$	Inhibición presináptica: SNA y SNC; otros efectos: células yuxtglomerulares (\downarrow renina*), células β pancreáticas (\downarrow insulina), adipocitos (\downarrow lipolisis), plaquetas (agregación plaquetaria)	
		$\beta 2$	Estimulación presináptica fibras NA; relajación m. detrusor, hígado (glucogenolisis)	

Los adrenoceptores $\beta 1$ se localizan principalmente en el corazón donde son responsables de los efectos inotrópicos y cronotrópicos positivos de las CAs; los receptores $\beta 2$, presentan una distribución más amplia localizándose presinápticamente en las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, en el músculo liso (donde producen broncodilatación, vasodilatación y relajación del músculo liso visceral como el de la vejiga), hígado (glucogenólisis) y músculo esquelético (temblor muscular), mientras que los receptores $\beta 3$ adrenérgicos han sido identificados en el tejido adiposo (lipólisis) y músculo esquelético (termogénesis; *Rang y Dale, 2008*).

Los receptores $\alpha 1$ adrenérgicos se encuentran también en los ganglios espinales y en la médula espinal así como en la corteza cerebral. Estos receptores median la contracción del músculo liso vascular, bronquial y uterino disminuyendo las secreciones nasales y broquiales; además de inducir la sudoración y la glucogenólisis (*Day et al., 1997; Nalepa et al., 2005*).

Los receptores α_2 adrenérgicos se encuentran ampliamente distribuidos tanto en el SNC (MacDonald *et al.*, 1995) como a nivel periférico (Handy *et al.*, 1993). Se ha demostrado que participan en la regulación de un amplio espectro de funciones fisiológicas que incluyen la inhibición de la liberación de neurotransmisores por la médula adrenal, la regulación de la presión arterial (contracción mediante efecto directo sobre el músculo liso vascular/dilatación mediante la inhibición de la liberación de NA) y de la frecuencia cardíaca (bradicardia de origen central), respiración (de presión central), disminución de la salivación y de la motilidad gastrointestinal (inhibición de la liberación de ACh), la inhibición de la liberación de insulina por las células β pancreáticas y de renina por el aparato yuxtaglomerular, así como la inducción de sedación, analgesia y emesis (Small *et al.*, 2001).

Los receptores α_2A y α_2C son de localización predominantemente presináptica en el SNC y en el SNP ubicándose a nivel subcelular en la proximidad de los canales Ca_v de tipo L y N y de canales de K^+ con rectificación interna (GIRK; Bünnemann *et al.*, 2001). La activación de estos subtipos de receptores α_2 adrenérgicos está relacionada con la sedación, la analgesia y los efectos simpaticolíticos.

Los receptores α_2B se localizan postsinápticamente tanto a nivel neuronal como en las células efectoras del SNS. Así, con carácter general mediarían la contracción del músculo liso vascular (Enlace *et al.*, 1995; Link *et al.*, 1996; Enlace *et al.*, 1996; Altman *et al.*, 1999; Starke *et al.*, 2001; **Figura 1.27**); sin embargo sería el subtipo α_2C el responsable de la vasoconstricción cutánea dependiente de la activación simpática que tiene lugar en respuesta al frío.

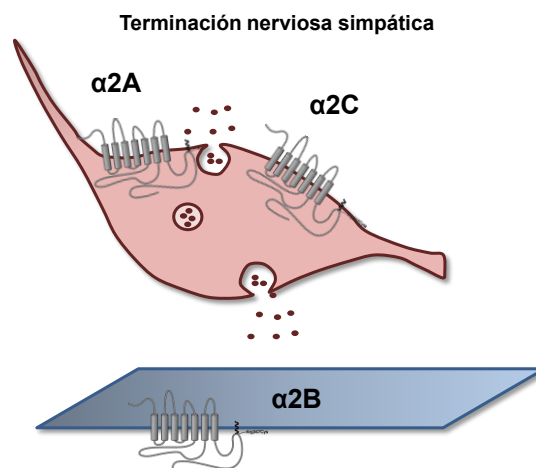


Figura 1.27. Localización de los subtipos de receptores α_2 adrenérgicos. Los receptores α_2A y α_2C funcionan como autorreceptores inhibidores de la liberación de NA en las terminaciones nerviosas noradrenérgicas centrales y periféricas; por el contrario, los receptores α_2B están localizados postsinápticamente, tanto en los somas y dendritas de las neuronas centrales como en las células efectoras del SNS. Tomada con modificaciones Philipp *et al.*, 2002.

Los receptores α_2 influyen en la presión arterial actuando a muy distintos niveles. La administración sistémica de un fármaco agonista α_2 adrenérgico que sea capaz de atravesar la barrera hematoencefálica (BHE) produce un efecto bifásico sobre la presión arterial: después de una corta fase hipertensiva aparece una fase hipotensiva más pronunciada y duradera. Curiosamente, las dos fases de la respuesta están mediadas por dos subtipos de receptores α_2 : Los receptores α_{2B} situados en los miocitos de los vasos son los responsables de la fase hipertensiva inicial, mientras que la hipotensión de larga duración está mediada por los receptores α_{2A} localizados en distintos núcleos del bulbo raquídeo que tras su activación reducirán la actividad simpática (Link *et al.*, 1996; MacMillan *et al.*, 1996; Altmann *et al.*, 1999; Giovannitti *et al.*, 2015; **Figura 1.28**).

Los adrenoceptores α_2 también actúan como autorreceptores reduciendo la secreción de CAs por las células cromafines de la médula adrenal (Kleppisch *et al.*, 1992; Brede *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2006; Lymperopoulos *et al.*, 2007; Knaus *et al.*, 2007) mediante la inhibición de canales Ca_v de tipo L sensibles a dihidropiridinas. El subtipo predominantemente expresado en las células cromafines humanas y de rata, parece ser el α_{2A} mientras que en las de ratón sería el α_{2C} (Moura *et al.*, 2006; Lymperopoulos *et al.*, 2007b). Además de los receptores inhibidores α_2 , las células cromafines de rata también expresan receptores β_2 adrenérgicos estimuladores de la AC que promueven una mayor secreción de CAs (autorreceptores facilitadores; Baldelli *et al.*, 2004).

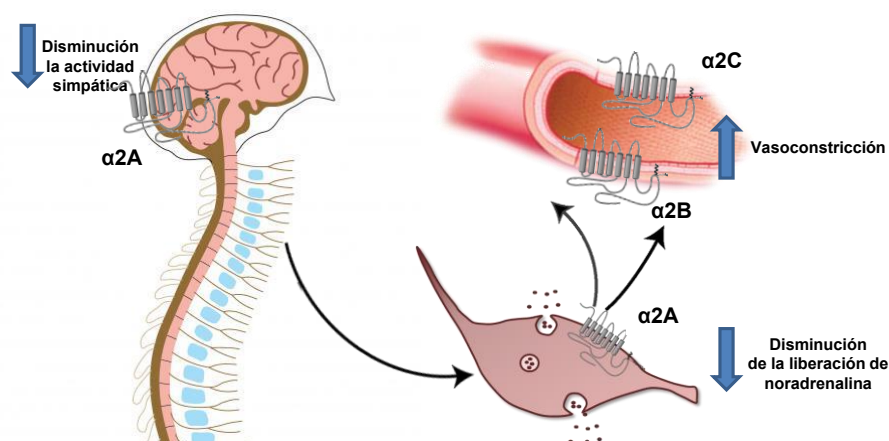


Figura 1.28. Regulación de la presión arterial por diferentes subtipos de receptores α_2 -adrenérgicos. La activación de los receptores α_{2A} conduce a una disminución de la presión sanguínea mediante la inhibición del sistema nervioso simpático a nivel bulbar, así como de la liberación de NA de las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas postganglionares. Los receptores α_{2B} pueden contrarrestar este efecto causando vasoconstricción directa. Los receptores α_{2C} participan en la vasoconstricción periférica inducida por la exposición al frío. Tomada con modificaciones Philipp *et al.*, 2002.

Tabla 1.3. Agonistas y antagonistas de los receptores adrenérgicos.

Receptores adrenérgicos	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\beta 1$	$\beta 2$	$\beta 3$
Agonistas selectivos	<ul style="list-style-type: none"> Fenilefrina Oximetazolina Fenilpropanolamina Metoxalina 	<ul style="list-style-type: none"> Clonidina Medetomidina Dexmedetomidina Fadolmidina Xilacina 	<ul style="list-style-type: none"> Isoprenalina Dobutamina Xamoterol 	<ul style="list-style-type: none"> Isoprenalina Salbutamol Clenbuterol Salmeterol 	<ul style="list-style-type: none"> BRL37344
Antagonistas selectivos	<ul style="list-style-type: none"> Prazosina Doxazosina Terazosina 	<ul style="list-style-type: none"> Atipamezol Yohimbina Idazoxan 	<ul style="list-style-type: none"> Propranolol Atenolol Metoprolol 	<ul style="list-style-type: none"> Propranolol Butoxamina 	<ul style="list-style-type: none"> Propranolol

1.4.1. Los receptores adrenérgicos en el dolor y la analgesia

Los receptores α y β tienen un papel clave en la regulación el efecto nociceptivo de la NA y A, respectivamente (Segall *et al.*, 2012). Los receptores $\alpha 2$ presinápticos actúan como autorreceptores al mediar la inhibición de liberación de NA por las terminaciones nerviosas noradrenérgicas (Hoffman and Williams, 2012). Su activación en el SNS –espinal y supraespinal– induce analgesia y sedación con predominio de la actividad vagal en el corazón, lo que se traduce en una caída de la frecuencia y del gasto cardíaco. El uso de agonistas $\alpha 2$ como coadyuvantes anestésicos ha permitido reducir las dosis y por tanto los efectos adversos de los fármacos anestésicos generales, particularmente en el ámbito de la medicina veterinaria (Ebert *et al.*, 2000). Entre los agonistas $\alpha 2$ se encuentran fármacos como la clonidina, la medetomidina o la dexmedetomidina, siendo este último el isómero activo del anterior, por lo que presenta una menor incidencia de efectos adversos hemodinámicos y respiratorios. Los efectos de estos fármacos pueden ser revertidos con antagonistas de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos como el atipamezol, la yohimbina o la rauwolscina (Pertovaara *et al.*, 2005). Sin embargo, la sedación y la depresión cardiovascular inducida por los agonistas $\alpha 2$ convencionales constituyen un inconveniente importante para su utilización en la clínica como analgésicos para el tratamiento del dolor neuropático, ello ha llevado al desarrollo de fármacos como la fadolmidina (MPV2426 o radolmidina), un fármaco agonista selectivo $\alpha 2$ con reducido paso de la BHE y que presenta una potencia antinociceptiva similar a la de la dexmedetomidina (Pertovaara, 2004).

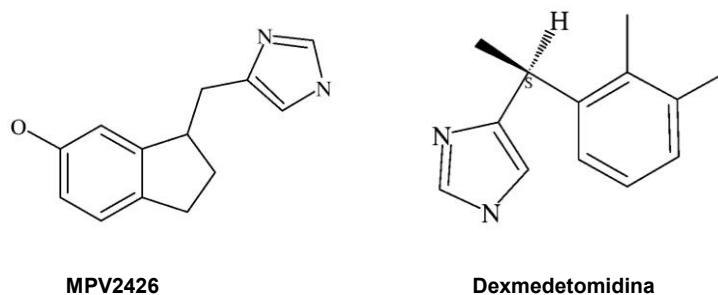


Figura 1.29. Estructura química del MPV2426 y de la dexmedetomidina. Tomada con modificaciones Pertovaara *et al.*, 2004.

Además, como hemos comentado anteriormente, el hecho de que las neuronas nociceptivas primarias expresen receptores $\alpha 1$ (fundamentalmente $\alpha 1A$) y $\alpha 2$ ($\alpha 2C$ (80%) y $\alpha 2A$; *Shi et al., 2000*) y que algunas células del sistema inmune como los macrófagos y los linfocitos también expresen receptores α y β adrenérgicos (*Nance and Sanders, 2007*), hacen que los fármacos adrenérgicos puedan modular la excitabilidad de las neuronas aferentes primarias tanto por una acción directa sobre las mismas e indirecta, al actuar sobre el sistema inmune o el SNS. Las fibras aferentes nociceptivas primarias intactas son escasamente sensibles a la estimulación simpática, mientras que si existe inflamación o lesión, la estimulación suele producir dolor (*Sato and Perl, 1991; Pertovaara, 2013*). En condiciones patológicas, el efecto neto de los agonistas adrenérgicos administrados periféricamente es el resultado de sus acciones sobre diferentes tipos de adrenoceptores expresados tanto en neuronas sensitivas como simpáticas así como en células inmunitarias. En general, en la mayoría de las condiciones patológicas el efecto de un agonista $\alpha 2$ administrado periféricamente suprime el dolor mientras que un agonista $\alpha 1$ agravaría el mismo.

II. PLANTEAMIENTO Y OBJETIVOS

“El alma resiste mejor los dolores agudos que la tristeza prolongada”

Jean-Jacques Rousseau

El dolor es el primer motivo de consulta en medicina humana. Puede ser un síntoma que alerta sobre la presencia de una enfermedad susceptible de tratamiento específico (dolor nociceptivo) o constituir una entidad patológica por sí misma (dolor neuropático). En todo caso, siempre resulta obligado su tratamiento. En la primera de las situaciones, un correcto abordaje terapéutico implicará el tratamiento de la enfermedad de base junto con la administración de fármacos con efecto analgésico o antiinflamatorio. La resolución de la enfermedad subyacente marcará el final del tratamiento analgésico. Por el contrario, existen procesos cuya característica fundamental es la alteración del procesamiento de la información nociceptiva. Se trata de un fenómeno típico del dolor neuropático pero también que también acompaña a la cronificación de del dolor primariamente nociceptivo. En tales circunstancias, el dolor es consecuencia pero también causa de si mismo a través de fenómenos como la sensibilización central y periférica, y la analgesia el principal cunado no único objetivo terapéutico.

Si bien en el tratamiento del dolor nociceptivo el reto terapéutico consistiría actualmente en el logro de mayores niveles de seguridad de los fármacos analgésicos, en el tratamiento del dolor neuropático la situación actual viene marcada por la falta de eficacia. Existe pues un vacío terapéutico que demanda el desarrollo de nuevo fármacos que actúen sobre nuevas dianas terapéuticas. Este es el contexto en el que se enmarca el presente *Trabajo de Tesis Doctoral* y de la línea de trabajo que se se lleva a acabo en el grupo de investigación en el que se ha realizado. Este grupo ha dedicado bastantes años al estudio de los mecanismos implicados en la liberación de CAs por las células cromafines de la médula adrenal y, más recientemente, ha investigado los cambios que en dichos mecanismos pueden producirse en alguna forma de estrés crónico. Por otro lado, diversas evidencias clínicas y experimentales han relacionado la activación del sistema simpatoadrenomedular con la hiperalgesia así como con algunos cuadros de dolor crónico (fibromialgia, síndrome del intestino irritable, etc.). Ello nos ha motivado a plantear el estudio de posibles nuevas dianas para fármacos que modulando la actividad del sistema simpatoadrenal pudieran ser de utilidad en el tratamiento del dolor.

El objetivo o pregunta general del presente trabajo es doble y hace referencia al carácter bidireccional de la relación entre dolor y estrés: i) ¿Es el dolor crónico neuropático capaz de generar una respuesta de estrés en la que participe el sistema simpatoadrenal?; ii) ¿Influye dicha respuesta en la fenomenología dolorosa?

Dar respuesta a dichas preguntas, implica la consecución de los siguientes objetivos concretos:

- 1º. Implementar un modelo de dolor neuropático consistente en la constricción crónica (CCI) del nervio ciático de la rata.

2°. Evaluar el modelo de dolor neuropático como estresor, capaz de inducir cambios adaptativos en el sistema simpatoadrenal.

3°. Analizar la contribución del sistema simpatoadrenal a la fenomenología del dolor neuropático.

4°. Estudiar el receptor α_2 adrenérgico de las células cromafines de la médula adrenal como posible diana de fármacos útiles en el tratamiento del dolor neuropático.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

*“Abandonarse al dolor sin resistir, suicidarse para sustraerse de él, es abandonar el campo de batalla sin haber luchado”
Napoleón Bonaparte*

3.1. Animales de experimentación

Los animales utilizados fueron ratas *Sprague Dawley* (machos de 6-8 semanas a la recepción y peso de 200-220 g) procedentes del animalario de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid (Número de Registro ES-28079-0000097 de la Comunidad Autónoma de Madrid) y mantenidos en las instalaciones del Hospital Clínico Veterinario de la Universidad Complutense de Madrid con ciclos de iluminación de 12 h (8:00-20:00 h), a temperatura de 23 °C y provistos de alimento y agua *ad libitum*. Todos los experimentos descritos en este trabajo se realizaron de acuerdo a la Directiva de la Comunidad Europea (2010/63/UE) incorporada al ordenamiento jurídico español mediante el Real Decreto 53/2013, aprobado el 1 de febrero, por el que se establecen las normas aplicables para la protección de los animales utilizados, criados o suministrados con fines de experimentación y otros fines científicos, incluyendo la educación y la docencia.

3.2. Materiales y equipos

3.2.1. Fármacos y productos químicos

A continuación, se refieren los productos químicos utilizados en los distintos procedimientos experimentales junto a su procedencia que quedan recogidos en la **Tabla 3.1**.

Tabla 3.1. Productos químicos utilizados en los procedimientos experimentales.

Uso y categoría	Producto	Casa comercial
Anestesia	Imalgene® Ketamina 100 mg/mL Domtor® Medetomidina 1 mg/mL	Merial Labs., España Laboratorios Esteve, España
Evaluación comportamental	Dexdomitor® Dexmedetomidina 0,5 mg/mL Antisedan® Atipamezol 5 mg/mL MPV2426 SKF29661 Solución salina inyectable (Veh.) Adrenalina, Prazosina, Propranolol Acetona	Laboratorios Esteve, España Laboratorios Esteve, España Orion Pharma. Finlandia Glaxo Smith Kline (EEUU) Braun, España Sigma-Aldrich Co., España Sigma-Aldrich Co., España
Cultivo de células cromafines y neuronas DRGs	Solución salina de Hank, solución de penicilina, estreptomicina, anfotericina B, medio de Eagle modificado por Dulbecco (DMEM), poli-D-lisina, collagenasa XI Collagenasa tipo I Suero bovino fetal	Sigma-Aldrich Co., España Worthington, EEUU Biowhittaker, Reino Unido
Registros electrofisiológicos: ▪ Fármacos ▪ Sales y otros	Acetilcolina Atipamezol Dexmedetomidina Guanetidina MPV2426 SKF29661 CsCl, KCl, NaCl, Ácido 4-(2-Hidroxietil) piperazin-1-etanosulfónico (HEPES), Na ²⁺ ATP, Li ³⁺ GTP, Glucosa, Ácido etilenglicol-bis (2-aminoetileter)-N,N, N',N'-tetraacético (EGTA), MgCl ₂ CaCl ₂ , Agar HCl, NaOH, Etanol, NaH ₂ PO ₄ , Na ₂ HPO ₄ , NaHCO ₃ , KH ₂ PO ₄	Sigma-Aldrich Co., España. Tocris, Reino Unido Santa Cruz Biotech., España Tocris, Reino Unido Orion Pharma., Finlandia Glaxo Smith Kline, EEUU Braun, España Sigma-Aldrich Co., España Panreac, España
Determinación de CAs	Ácido perclórico	Sigma-Aldrich Co., España
Inmunohistoquímica Anticuerpos primarios: Otros:	Anti-P2X3 de conejo frente a rata Anti-TH de cobaya frente a rata Anti-VACHT de cabra frente a rata DAPI Triton X-100, p-formaldehido, albúmina bovina FluorSave™	Alomone, Israel Synaptic systems, Alemania Santa Cruz Biotech., España Life Technologies, España Sigma-Aldrich Co., España Merck, Alemania

3.2.2. Materiales, equipos y software

Seguidamente, se recogen en la siguiente tabla los materiales y equipos utilizados junto a su procedencia (**Tabla 3.2**).

Tabla 3.2. Materiales y equipos utilizados en los procedimientos experimentales

Uso y categoría	Equipo, material o programa (Casa comercial)
Material quirúrgico	Bisturí, pinzas, tijeras, pinza hemostática, guantes, seda trenzada 6/0, <i>Catgut</i> crómico 4/0 (Lorca Marín, España)
Evaluación comportamental	Estesiómetro plantar dinámico (Ugo Basile, Italia) Rota-rod (Ugo Basile, Italia) Cronómetro, pipetas, jeringa Hamilton® (50 µL) Analgesímetro (Randall-Selitto, Ugo Basile, Italia)
Medición de la presión arterial	Sistema de monitorización de presión arterial y frecuencia cardiaca (LETICA, Cibertec, España) Máquina de anestesia (Paragon Medica, USA) Catéteres de polietileno de diámetro diverso (2-5 mm)
Registros electrofisiológicos:	
▪ Material fungible	Tubos capilares de borosilicato Kimble Chase, diámetros interno de 1,5 mm y externo de 1,8 mm (Gerresheimer, Alemania), filtros 0,25 µm, jeringas desechables, tubos de polietileno
▪ Instrumentación	Osmómetro VAPRO 5520 (Wescor, EEUU), sonicador Sonics Material Vibracell (Damburi, EEUU), pHmetro Basic 20+ (Crison, España), agitador magnético SBS A-32 (SBS Labscience, España), congelador -80 °C HS 3686 (Hettich, Alemania), nevera T1414 Comfort (Liebherr, Suiza), Lupa SZ40 (Olympus, Japón), centrífuga Universal 32R para tubos eppendorf® (Hettich, Alemania), amplificador de <i>patch-clamp</i> EPC10 (HEKA Elektronik, Alemania), ordenador HP xw4300 WorkStation, mesa antivibratoria LW3036B-OPT (Newport, EEUU), microscopio BX51WI (Olympus, Japón), cámara DL604M-OEM (Andor, EEUU), micromanipulador PCS-P560 (Burleigh, EEUU), estirador vertical programable PP830 (Narishige, Reino Unido), sistema de administración neumática de fármacos PDES-02DX (npi electronic, Alemania), cámara de perfusión DH-40iL (Warner Instruments, EE.UU)
Cultivos celulares y cortes de la glándula adrenal y DRG	Campana de flujo laminar Hera Safe (Heraeus, Alemania), centrífuga Universal 32R (Hettich, Alemania), incubador Hera Cell (Heraeus, Alemania), vibratomo Integraslice 7550MM (Campden Instruments, Reino Unido), placas Petri 35 mm (Iwaki Brand Scitech Div., Japón), pipetas Pasteur de vidrio y plástico, cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co, Alemania), tubos Falcon® y eppendorf®, microscopio DM IL de cultivos y cortes de DRG (Leica Microsystems, Alemania), criostato (HM 505E, Microm, Heidelberg, Alemania)
Software para el registro y análisis de datos	GraphPad Prism 5.0v (GraphPad Software Inc., EEUU), Microsoft Excel 14.0v, Office 2013. (Microsoft® Corporation, Redmond, EEUU), Igor Pro 5.05 (WaveMetrics, EEUU), PatchMaster V2x65 y FitMaster V2x60 (HEKA Elektronik, Alemania)

3.3. Modelos Experimentales

3.3.1. Modelo de dolor neuropático: Constricción crónica del nervio ciático

En este estudio se utilizó como modelo experimental de dolor neuropático una neuropatía periférica crónica secundaria a la constricción del nervio ciático (*chronic constriction injury, CCI*; Bennet y Xie, 1988). Dicho procedimiento fue realizado por la Dra. Mercedes Sánchez de la Muela (Hospital Clínico Veterinario Complutense) en animales anestesiados con una combinación de ketamina (100 mg/kg) y medetomidina (100 µg/kg) administradas intraperitonealmente (I.P.). Tras exponer el nervio ciático mediante disección del bíceps femoral derecho se procedió a la realización de cuatro ligaduras constrictivas alrededor del nervio a intervalos de 1 mm de separación con *catgut* crómico 4/0. Debe señalarse que la constricción producida por la ligadura determina la degeneración de las fibras nerviosas, que se acompaña de una respuesta inflamatoria localizada en torno a la zona de lesión (**Figura 3.1**).

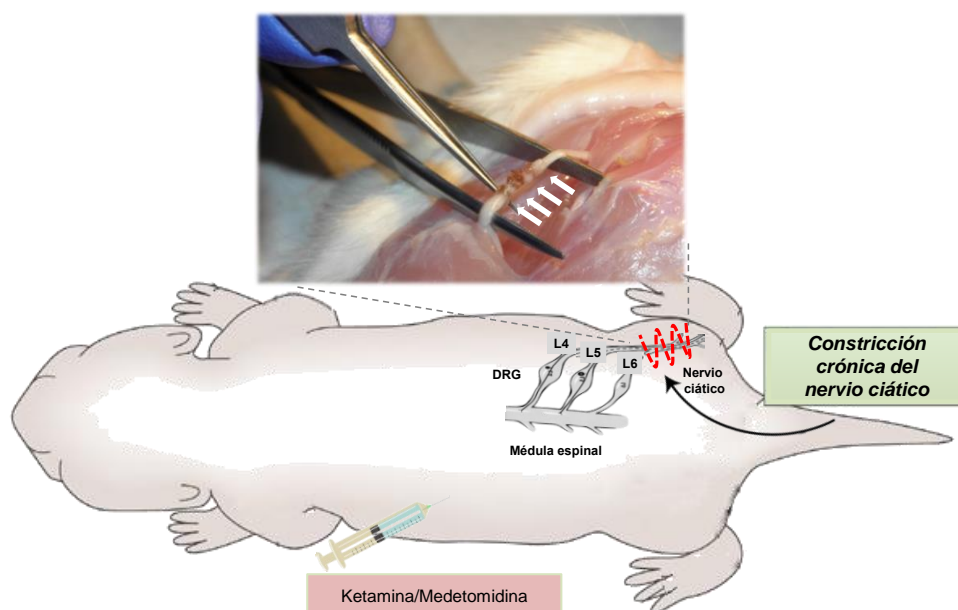


Figura 3.1. Constricción crónica del nervio ciático. Representación del procedimiento de la CCI del nervio ciático. En la *parte superior* muestra la imagen *post mortem* del nervio alrededor del cual se disponen 4 ligaduras constrictivas (flechas blancas). Seguidamente se representa de forma esquemática la localización en la extremidad posterior derecha de la CCI en la rata. En la *parte inferior* la administración de la anestesia por vía I.P., antes de realizar el procedimiento quirúrgico. Tomada con modificaciones de Fitzgerald y Walker, 2009.

Como grupo control se emplearon diferentes tipos de animales. Así, se recurrió tanto a animales en los que se efectuó el procedimiento quirúrgico únicamente hasta la exposición del nervio ciático (*Sham*), animales no operados (control), así como la extremidad posterior izquierda de los animales CCI.

Tras la operación, todos los animales sometidos a cualquier procedimiento quirúrgico, tanto CCI como *Sham*, se mantuvieron en jaulas individuales, realizándose un seguimiento de la cicatrización y eventual infección de la herida quirúrgica a lo largo de los 7 días siguientes.

3.3.2. Modelo de estrés crónico por frío

El protocolo de estrés crónico por frío conlleva la exposición de los animales alojados en jaulas individuales en una cámara termostatzada a una temperatura de 4 °C durante 5 días. Las restantes condiciones de estabulación (ciclo de iluminación, acceso a comida y bebida) fueron idénticas a las ya descritas. El correspondiente grupo de animales control fue alojado en el mencionado cuarto a la temperatura ambiente de 23 °C (Colomer *et al.*, 2008; 2010).

3.4. Experimentos “*in vivo*”

3.4.1. Evaluación fisiológica

Los roedores manifiestan el dolor mediante cambios en su comportamiento y en algunos parámetros fisiológicos relacionados con la actividad metabólica (peso corporal) y del sistema nervioso simpático (tamaño y contenido en CAs de las glándulas adrenales). Los procedimientos para medir el dolor en animales se basan en la valoración rigurosa de esos comportamientos y parámetros (Bolaños *et al.*, 2013).

Por ello, desde el momento de su ingreso, se procedió a una revisión de la apariencia, comportamiento espontáneo y a la determinación del peso corporal de los animales al objeto de excluir aquellos que presentaran cualquier indicio de patología. Así mismo, se realizó un seguimiento del peso de los animales en los grupos control (no operados), *Sham* y CCI desde el día del ingreso (día -7) y en los días -5 y -1 y durante las 3 semanas posteriores a la intervención (7-21 postcirugía, coincidiendo con las evaluaciones conductuales), incluyendo una medida a día 3 con el fin de comprobar el efecto inmediato de la operación sobre el peso corporal. Además, se realizó un seguimiento del peso y contenido en CAs de las glándulas adrenales procedentes de los diferentes grupos de animales así como de aquellos que fueron tratados con los fármacos estudiados en este trabajo. Algunas de las glándulas también fueron empleadas en los experimentos funcionales *in vitro* (Ver apartado 3.5).

En el caso del modelo de estrés crónico por frío, el seguimiento del peso se realizó inmediatamente antes del inicio y tras los 5 días de exposición al frío.

3.4.2. Evaluación conductual

La evaluación conductual de hiperalgesia y alodinia mecánicas y al frío de los animales (CCI y control) se llevó a cabo de lunes a viernes y de 9:00 h a 12:00 h en los laboratorios de Farmacología de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid. Con

carácter previo a las distintas valoraciones los animales se aclimataron a la sala y a los compartimentos de evaluación durante un mínimo de 30 min.

Con la finalidad de valorar los efectos de la cirugía, en los animales CCI y *Sham*, se compararon las respuestas respecto al nivel basal, determinado en la extremidad trasera del animal, correspondiente a la media de tres determinaciones realizadas a lo largo de la semana anterior a la cirugía y que se denominada como respuesta basal (-1). El día de la intervención fue considerado día 0, iniciándose la evaluación de 5-7 días antes de la misma (días -7 y -5) y extendiéndose hasta 3 semanas después (día 21).

A fin de tratar de aplicar el “principio de las tres Rs” – Reducción, Refinamiento, Reemplazamiento- que inspira el uso de animales en procedimientos científicos; decidimos valorar la utilización como control de la extremidad posterior izquierda o contralateral a la intervenida en las ratas CCI y comparar la respuesta obtenida en ella con las de animales *Sham* e incluso con la de animales no sometidos a ningún procedimiento quirúrgico. La obtención de resultados similares posibilitaría la reducción tanto del número de animales usados en los experimentos como de los procedimientos quirúrgicos que habría que practicar. Los animales CCI que presentaron alteraciones durante el período de evaluación, tales como automutilación o/e inflamación en la extremidad, fueron excluidos del experimento.

Las distintas pruebas comportamentales se realizaron en los distintos grupos de animales y días inmediatamente antes y después de la administración de fármacos presumiblemente capaces de modificarlas (Ver apartado 3.4.2.5.).

3.4.2.1. Alodinia mecánica

Se utilizó un protocolo adaptado de Nirogi et al. (2012) en el que se midió el umbral de retirada, expresado en gramos (g), de la extremidad posterior durante un estímulo mecánico, aplicado sobre la superficie plantar con un estesiómetro plantar dinámico (*dynamic plantar aesthesiometer*; Ugo Basile, Italia). El dispositivo cuenta con habitáculos individuales que tienen como piso una rejilla metálica (con espacios de 5 x 5 mm) sobre la que se apoyan las extremidades del animal y que puede ser atravesada por un filamento de 0,5 mm de diámetro que desarrolla una fuerza creciente de 2,5 g/s sobre la superficie plantar con un valor máximo de 50 g (20 segundos, **Figura 3.2**). Cada valoración representa la media de tres ensayos consecutivos realizados a intervalos de 3 a 5 min (Nirogi et al., 2012).

Las valoraciones se realizaron la semana previa a la intervención durante tres días alternos, considerando como respuesta basal o -1 a la media de las respuestas. En los animales operados, la primera valoración postcirugía se realizó al menos 7 días después de la intervención con el fin de permitir una correcta cicatrización de la herida quirúrgica y el establecimiento del cuadro de dolor

neuropático repitiéndose en los días posteriores en función de las características de cada protocolo experimental.

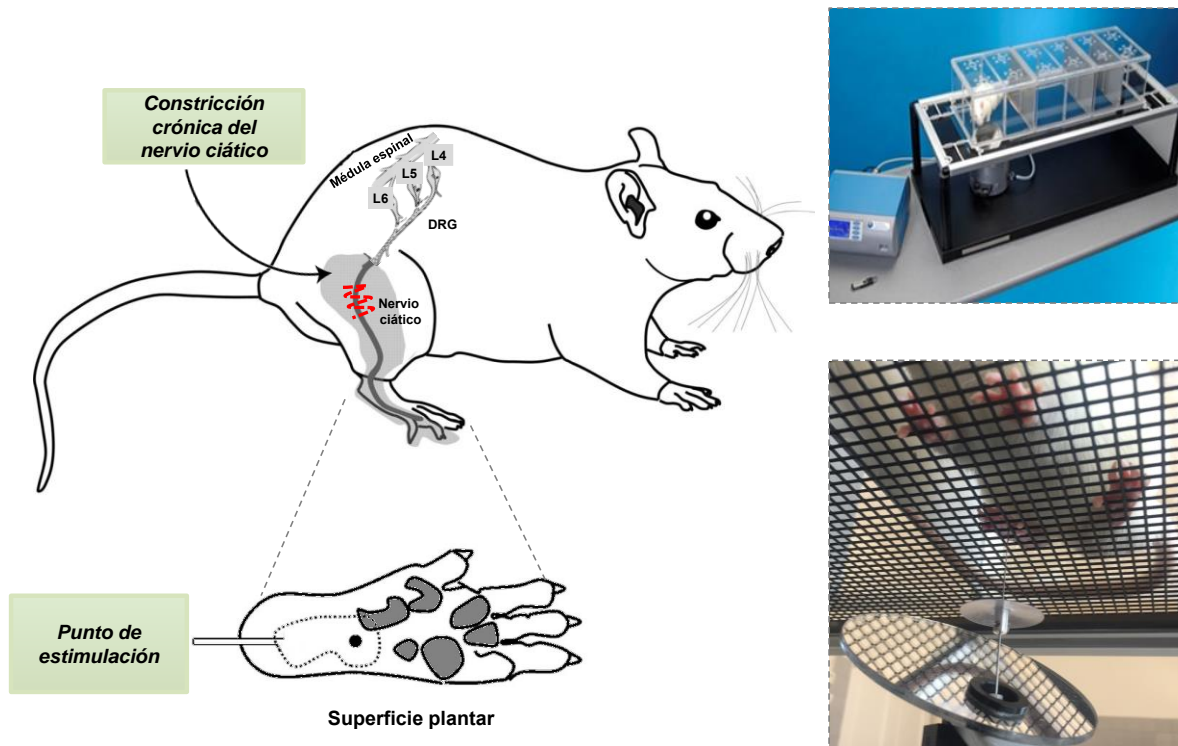


Figura 3.2. Valoración de la alodinia mecánica. En la *parte superior izquierda* se muestra de forma esquemática la extremidad posterior derecha en la que se practicó la constricción crónica del nervio ciático (CCI) y en la *parte inferior* el detalle de la superficie plantar con el punto de estimulación. En la *parte superior derecha* se observa una visión de conjunto del estesiómetro utilizado en la valoración de la alodinia mecánica, mientras que el panel inferior se muestran las extremidades del animal apoyadas sobre la rejilla que será atravesada por el filamento de 0,5 mm de diámetro del estesiómetro plantar en su ascenso hasta tomar contacto con la zona de estimulación en la extremidad posterior. Tomada con modificaciones de *Boada et al., 2014*.

3.4.2.2. Alodinia al frío

La administración de acetona tópicamente ocasiona una rápida disminución de la temperatura intradérmica, desde 32 °C a 25 °C; requiriéndose aproximadamente 5 min para el restablecimiento de la temperatura basal (*Pradham et al., 2010*).

El protocolo utilizado en este trabajo se basó en la aplicación, con ayuda de una pipeta automática unida a una cánula de polietileno de 100 µL de acetona (100%) desde la cara inferior de la rejilla de los habitáculos experimentales y expedidos sobre la superficie plantar de la extremidad posterior derecha desde la cara inferior de la rejilla del estesiómetro plantar. En cada extremidad se realizaron dos aplicaciones de acetona con un intervalo de 5 min.

Los resultados se expresan como la duración acumulada de la respuesta nocifensiva (lamido, temblor, contracción, agitación de la extremidad, entre otros) contabilizada durante los 60 segundos siguientes a cada aplicación (*Vissers y Meert., 2005; Pradhan et al., 2010; Figura 3.3*).

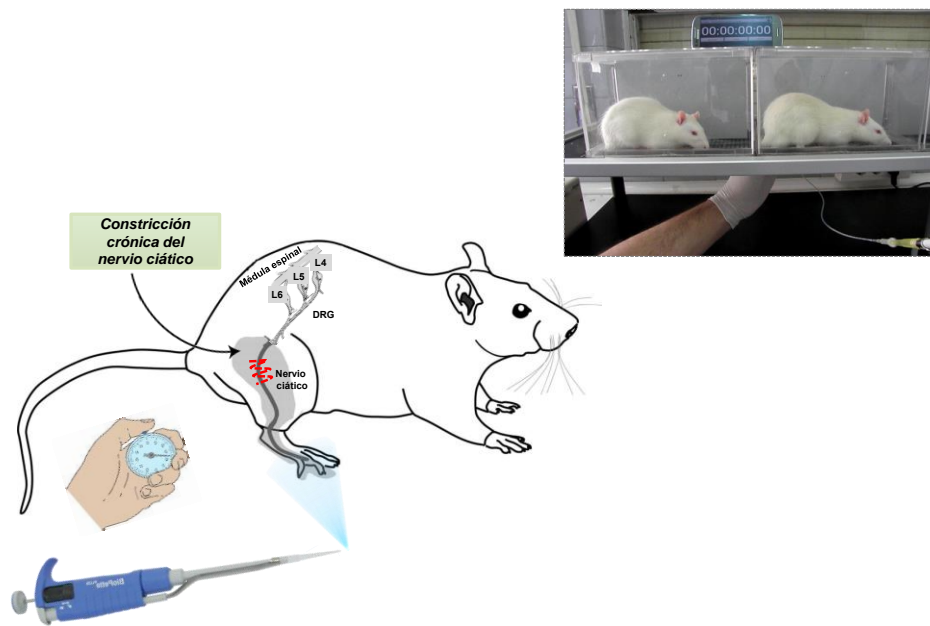


Figura 3.3. Valoración de la alodinia al frío (test de la acetona). En el *panel izquierdo* se muestra de forma esquemática la forma de administración de la acetona en el procedimiento, mediante una pipeta Eppendorff® con una punta modificada para expeler el contenido. En el *panel derecho*, se observa una fotografía panorámica de dos habitáculos experimentales y la forma de administración de la acetona sobre la superficie plantar de la extremidad posterior de la rata. Sobre los habitáculos se observa un cronómetro utilizado para cuantificar la duración de la respuesta nocifensiva. Tomada con modificaciones de *Boada et al., 2014*.

3.4.2.3. Hiperalgnesia mecánica

La hiperalgnesia mecánica se valoró mediante la prueba de *Randall y Selitto (1957)*, que recurre a un analgesímetro para la aplicación de presión sobre la pata trasera del animal. El dispositivo dispone de dos piezas de metacrilato, siendo una de ellas de forma cónica con punta roma capaces de comprimir un tejido con fuerza mecánica creciente a razón de 25 g/s. La fuerza máxima que se aplicó fue de 250 g y el parámetro cuantificado fue el umbral de retirada expresado en g (*Gunduz et al., 2011; Figura 3.4.*). El valor de cada respuesta representa la media de dos determinaciones sucesivas realizadas con un intervalo de 5 min (*Tiwari et al., 2011*). Los animales tuvieron un período de entrenamiento de al menos 7 días, evaluando a las ratas en días alternos, hasta conseguir la estabilidad de la respuesta.



Figura 3.4. Valoración de la hiperalgnesia mecánica (test de *Randall y Selitto*). Se muestra imagen del dispositivo y la forma de manipulación del animal para el estudio. Se coloca la superficie plantar del animal sobre la superficie opuesta a la punta roma, se ejerce presión creciente hasta la retirada de la pata del animal.

3.4.2.4. Ensayo de coordinación motora

Se utilizó el quipo Rota-rod (*Ugo Basile, Italia*) que proporciona una manera fácil de evaluar la coordinación motora en roedores. Se compone de un rodillo central estriado, sobre el que se coloca al animal, y que rota de acuerdo a distintos patrones (velocidad constante o acelerada). La existencia de distintas divisiones en el rodillo permite la valoración de la conducta de varios animales simultáneamente. La coordinación motora se evaluó a través del tiempo de permanencia de los animales sobre el rodillo girando a una velocidad continua de 16 rpm. El tiempo se computa desde el momento en que el animal se sitúa sobre el cilindro hasta que se cae del mismo, lo que se traduce en el desplazamiento de una palanca que acciona el interruptor de un reloj (*timer*) incorporado al aparato. El tiempo total de evaluación fue de 90 segundos dividido en dos intervalos de 45 s (*Guneli et al., 2007; Figura 3.5*). Sólo los animales de los grupos control (no operados) fueron sometidos a esta prueba, para la que fueron entrenados durante los días previos (datos no mostrados en *Resultados*). Únicamente aquellos animales que acreditaron un tiempo de permanencia de 90 s fueron incluidos en los experimentos. Al grupo de animales control se les sometió a la prueba tras haberles administrado el vehículo (Veh., solución salina, I.P.) y en ausencia de tratamiento farmacológico.

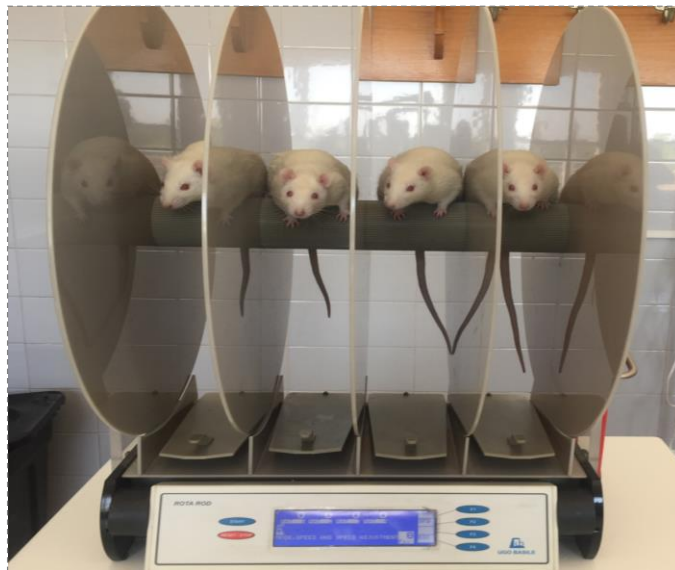


Figura 3.5. Ensayo de coordinación motora. Se muestra un grupo de ratas en un equipo Rota-rod. La coordinación motora se valoró mediante el tiempo de permanencia (90 segundos completados en dos fases) de los animales sobre el rodillo negro girando a una velocidad de 16 rpm.

3.4.2.5. Administración de fármacos en los estudios comportamentales

La evaluación de los efectos de los fármacos tanto en el grupo de animales CCI como en el control se cuantificó como el valor obtenido inmediatamente antes de su administración y se

comparó con el producido por la solución salina fisiológica (Veh., I.P.), habitualmente utilizada como vehículo.

Se recurrió a la vía intraperitoneal (250 μ L, I.P.) y subcutánea (intraplantar, i.pl., 20 μ L) para la administración de fármacos y de sus vehículos. Cuando se coadministraron fármacos agonistas y antagonistas por vía i.pl. se inyectó en primer lugar la dosis del antagonista (disuelto en 10 μ L de Veh.) seguido de los 10 μ L restantes conteniendo el agonista. Ambas soluciones, contenidas en la misma jeringa, estuvieron separadas por una burbuja de aire (aprox. 1 μ L, *Chen and Levine, 1999*; **Figura 3.6**). El transcurso desde la administración de los fármacos y la valoración de su efecto sobre el comportamiento animal dependió de la vía de administración, el tipo de fármaco utilizado y el objeto de estudio.

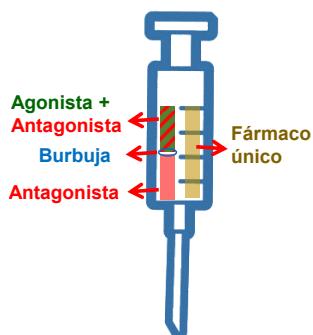


Figura 3.6. Administración intraplantar de fármacos. Se representa de forma esquemática la disposición de los fármacos en la jeringa utilizada en la administración intraplantar. Cuando se administró un solo fármaco, la jeringa contuvo una solución del mismo en 20 μ L de vehículo (Veh., solución salina, derecha); cuando se administró una combinación de un fármaco agonista y de otro antagonista, la solución de la jeringa se dividió en dos fases de 10 μ L cada una: la primera, más próxima a la guja, contenía el fármaco antagonista; la segunda, separada de la anterior por una burbuja de aire, contenía una mezcla de los dos fármacos (izquierda, *Chen and Levine, 1999*).

En los animales sometidos a la administración de diferentes dosis de un mismo fármaco, el intervalo mínimo entre administraciones consecutivas (periodo de lavado) fue de 48 h al objeto de evitar el fenómeno de arrastre (*carry over*, *McIntosh et al., 2009*) referente a la ausencia de efectos residuales del tratamiento anterior.

3.4.3. Medición de la presión arterial y la frecuencia cardíaca

Estos experimentos se realizaron, bajo anestesia por inhalación con isoflurano (2-4%; 0,5-1 L/min de aire). Se colocó al animal en posición decúbito dorsal al animal sobre una superficie estéril, procediéndose a rasurar y desinfectar la piel de la cara interna del tercio superior de la extremidad trasera. A continuación y tras comprobar que se había logrado el plano quirúrgico de la anestesia (ausencia de reflejo podal), se practicó una incisión en la piel de la región inguinal y se disecó el tejido subcutáneo hasta la visualización del paquete neurovascular. Utilizando unas pinzas de punta fina se aisló la arteria femoral a nivel de la bifurcación de la arteria inguinal.

Posteriormente y tras la colocación de unas pinzas hemostáticas en el extremo craneal de la arteria femoral se procedió a la incisión de la arteria con la ayuda de unas tijeras de microcirugía y a la inserción de un catéter de polietileno con la punta biselada que quedó sujeto a la pared arterial mediante una ligadura con hilo de seda (*Buhalog et al., 2010*). A continuación se retiró la pinza

hemostática y se conectó el catéter a un transductor de presión acoplado a un polígrafo (Letica, Cibertec, España).

Tanto la presión arterial media como la frecuencia cardíaca se monitorizaron previamente y después de la administración I.P. de fármacos durante un periodo aproximado de 120 min.

3.4.4. Extracción de muestras de suero para la cuantificación de catecolaminas

La cuantificación de CAs séricas se realizó en sangre extraída de la cola de animales anestesiados (2-4 % isoflurano y ventilación de 0,5-1 L/min de aire) en la cámara de inducción anestésica.

Una vez anestesiado el animal, se procedió a limpiar la superficie del tercio craneal de la cola con solución antiséptica de clorhexidina al 2% y a inducir la vasodilatación de la vena lateral de la cola mediante aplicación de calor. A continuación, y tras situar la cola sobre una superficie plana, se practicó un corte con una hoja estéril de bisturí, de aproximadamente 1-2 mm, perpendicular al eje de la cola, procediendo a recoger un volumen de sangre aproximadamente de 500 μ L.

Una vez recogida, la sangre se mantuvo en nevera a 4 °C durante una hora, posteriormente fue centrifugada (448 G; 10 min a 4 °C, centrífuga universal 32R, Hettich, Alemania) y el sobrenadante conteniendo el suero sanguíneo fue aspirado en alícuotas de 250 μ L que se mantuvieron a -80 °C (Congelador Hettich, HS3686, Alemania) hasta su remisión al Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa (Madrid) donde se procedió a la determinación de las CAs mediante HPLC acoplado a un espectrómetro de masas determinándose los valores de A y NA por separado, expresándose en ng/mL.

Alternativamente, se analizó el contenido en CAs en el suero de animales no anestesiados y sacrificados mediante concusión-decapitación. En este caso la sangre se recogía de la vena yugular alcanzándose un volumen de \approx 3 mL que se depositaba en un tubo Falcon®, procediéndose a partir de aquí de forma análoga al tratamiento de sangre de la cola para obtener el suero.

3.4.5. Determinación de CAs por HPLC-MS

Para la determinación de CAs se utilizó un sistema de HPLC, que consistió en un módulo de separación 1200 Serie (Agilent Technologies, Santa Clara, EE.UU.) controlado por un software (Agilent Mass Hunter Workstation Data Acquisition) acoplado a un sistema de detección de espectrometría de masas, técnica analítica, la cual identifica, cuantifica y proporciona la información sobre la estructura química de los analitos. Este procedimiento fue supervisado por la Dra. Ana Ruiz Nuño y realizado en el Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa (Madrid).

3.5. Experimentos “*in vitro*”

3.5.1. Cuantificación de las catecolaminas adrenoglandulares y plasmáticas

Una vez finalizados los procedimientos “*in vivo*”, se procedió al sacrificio de los animales mediante concusión-decapitación, a la extracción de sangre y a la extracción de las dos glándulas adrenales mediante una laparotomía media. En los animales no tratados con ningún fármaco, una de las glándulas fue procesada para la cuantificación de CAs y la otra destinada a la obtención de cultivos de células cromafines o de cortes de tejido.

Inicialmente, ambas glándulas fueron sumergidas en solución salina de Hank fría (4 °C), limpiadas, secadas con papel de filtro y pesadas en una balanza (Mettler, España). La glándula que iba a ser procesada para la cuantificación de CAs fue transferida a un microtubo conteniendo 500 μ L de una solución de ácido perclórico 0,1 N, y sometida a homogenización mediante sonicación con émbolo en frío (Sonics material vibracell, Damburí, EEUU). El homogenado así obtenido fue centrifugado (3000 G; 10 min a 4 °C en una centrífuga universal 32R, Hettich, Alemania) y el sobrenadante congelado a -80 °C (Congelador Hettich, HS3686, Alemania) hasta la cuantificación del contenido de CAs mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC) acoplado a un espectrómetro de masas. Por su parte, el pellet resultante de la centrifugación fue procesado para la cuantificación de proteínas con la intención inicial de normalizar el contenido de CAs respecto a la cantidad de proteínas, cálculo que no fue necesario al observarse una cantidad notablemente constante, sin modificaciones de los resultados tras su normalización (datos no mostrados). Ambos procedimientos analíticos fueron realizados en el Servicio de Farmacología Clínica del Hospital Universitario de la Princesa (Madrid), determinándose los valores de A y NA por separado, expresándose en μ g/glándula (**Figura 3.7**).

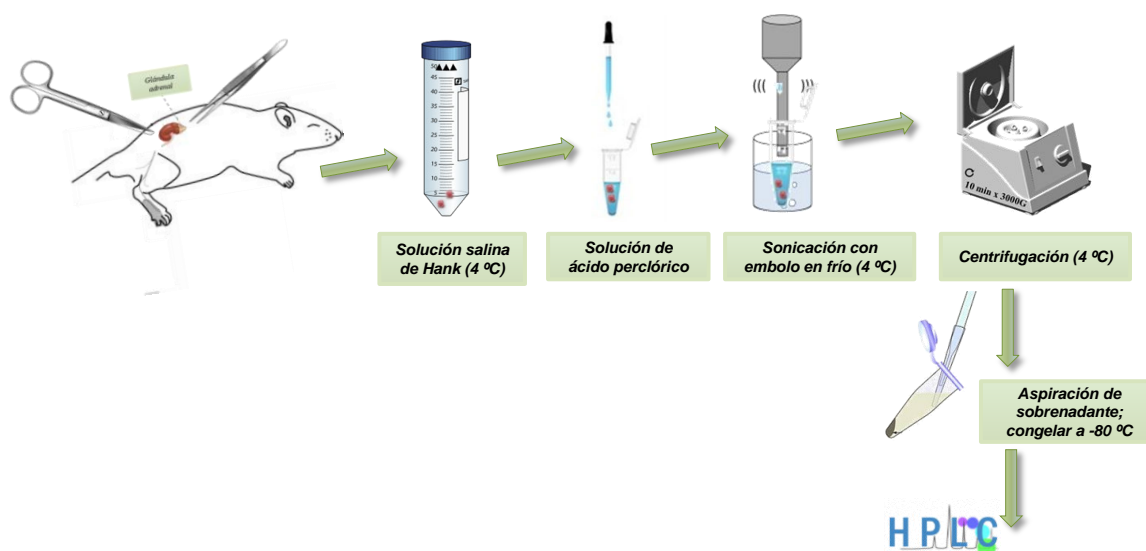


Figura 3.7. Cuantificación de las catecolaminas de la glándula adrenal. De forma esquemática se muestra el procedimiento seguido desde la extracción de la glándula adrenal hasta que se prepara la muestra para ser analizada mediante cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC).

3.5.2. Cultivo primario de células cromafines de la médula adrenal de rata

Las glándulas adrenales fueron sumergidas en solución salina de Hank fría (4 °C) a la que se había adicionado un preparado antibiótico a base de penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100 u/mL; 0,1 mg/mL y 0,25 µg/mL, respectivamente). A continuación, bajo campana de flujo laminar (Hera Safe, Heraeus, Alemania) se procedió a la descapsulación de las glándulas seguida de la disección, extracción y fraccionamiento de las médulas adrenales. Posteriormente, se inició el proceso de digestión con colagenasa I (500 u/mL) que tuvo lugar a 37 °C durante 30 min y con agitación mecánica cada 10 min mediante pipeta Pasteur de vidrio. Tras centrifugar la suspensión celular a 230 G una centrifuga Universal 32R (Hettich, Alemania) a 4 °C durante 10 min, se descartó el sobrenadante y el precipitado celular fue resuspendido en 1 mL del medio de cultivo de Eagle modificado por Dulbecco (*Dulbecco's modified Eagle's medium*; DMEM) suplementado con suero bovino fetal (5%) y con penicilina, estreptomicina y anfotericina B (100 u/mL; 0,1 mg/mL y 0,25 µg/mL, respectivamente).

Acto seguido, se depositaron fracciones de 0,5 mL de la suspensión celular sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co., Alemania) previamente tratados con poli-D-lisina (1 mg/mL durante 30 min) que fueron colocados en el interior de placas Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35 mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón). Finalmente, transcurridos 30 min, se añadieron 1,5 mL de DMEM en el interior de cada placa Petri y se procedió al traslado de las células a un incubador (Hera Cell, Heraeus, Alemania), donde se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. El rendimiento típico del cultivo fue de ≈ 100.000 células por glándula; las células fueron habitualmente utilizadas en las 12-48 h siguientes a su aislamiento (**Figura 3.8**)

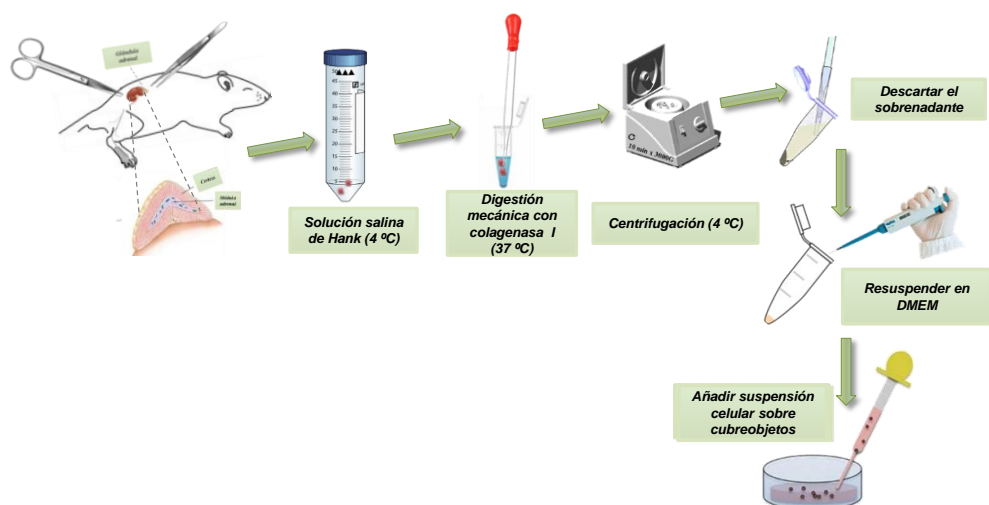


Figura 3.8. Protocolo para la obtención de un cultivo de las células cromafines de la médula adrenal de la rata. De forma esquemática se muestra el procedimiento seguido para el cultivo de las células cromafines desde la extracción de la glándula adrenal hasta la siembra de las mismas y su alojamiento en una placa Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35 mm de diámetro

3.5.3. Cultivo primario de neuronas del ganglio de la raíz dorsal de la rata

Una vez sacrificados los animales mediante concusión, se procedió a practicarles una laparotomía bilateral para extraer la columna que fue sumergida en una solución salina de Hank fría (4 °C). A continuación, bajo campana de flujo laminar Hera Safe, (Heraeus, Alemania) se realizaron laminectomías en todos los niveles vertebrales a fin de extraer la médula espinal del canal raquídeo, junto con los ganglios espinales.

Inmediatamente después, se disecaron los ganglios L5 y L6 y se transfirieron a una solución de DMEM conteniendo penicilina y estreptomicina (100 u/mL y 0,1 mg/mL, respectivamente). A continuación, se seccionaron las raíces nerviosas de los ganglios, al objeto de aislar los ganglios, que fueron sometidos a digestión enzimática con colagenasa XI (5 mg/mL) durante 60 min a 37 °C. La suspensión celular resultante fue centrifugada a 300 G (centrífuga Universal 32R, Hettich, Alemania) a 4 °C durante 5 min y tras descartar el sobrenadante, el precipitado fue resuspendido en medio DMEM suplementado con suero bovino fetal (10%), penicilina y estreptomicina (100 u/mL y 0,1 mg/mL, respectivamente).

La suspensión celular así obtenida se pasó a través de un filtro de 100 µm para eliminar los restos celulares y tras una nueva centrifugación (300 G; 5 min), se volvió a resuspender el precipitado celular en medio de cultivo DMEM, depositándose 40 µL sobre cubreobjetos de 10 mm de diámetro (Menzel GMBH & Co., Alemania) previamente tratados con poli-D-lisina (1 mg/mL, 30 min) y colocados en el interior de placas Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35 mm de diámetro (Iwaki Brand Scitech Div., Japón). Finalmente, se adicionaron 2,5 mL de DMEM en el interior de cada placa Petri (**Figura 3.9.**) y se procedió al traslado de las células a un incubador (Hera Cell, Heraeus, Alemania), donde se mantuvieron a 37 °C bajo una atmósfera de 5% de CO₂ y 95% de aire. Las células permanecieron en el incubador un mínimo de 24 h antes de su utilización en los experimentos electrofisiológicos. Los cultivos de neuronas de los ganglios espinales se realizaron a partir de animales control (no operados) y CCI. En los procedentes de este último tipo de animales se utilizaron exclusivamente los ganglios del lado ipsilateral a la lesión nerviosa.

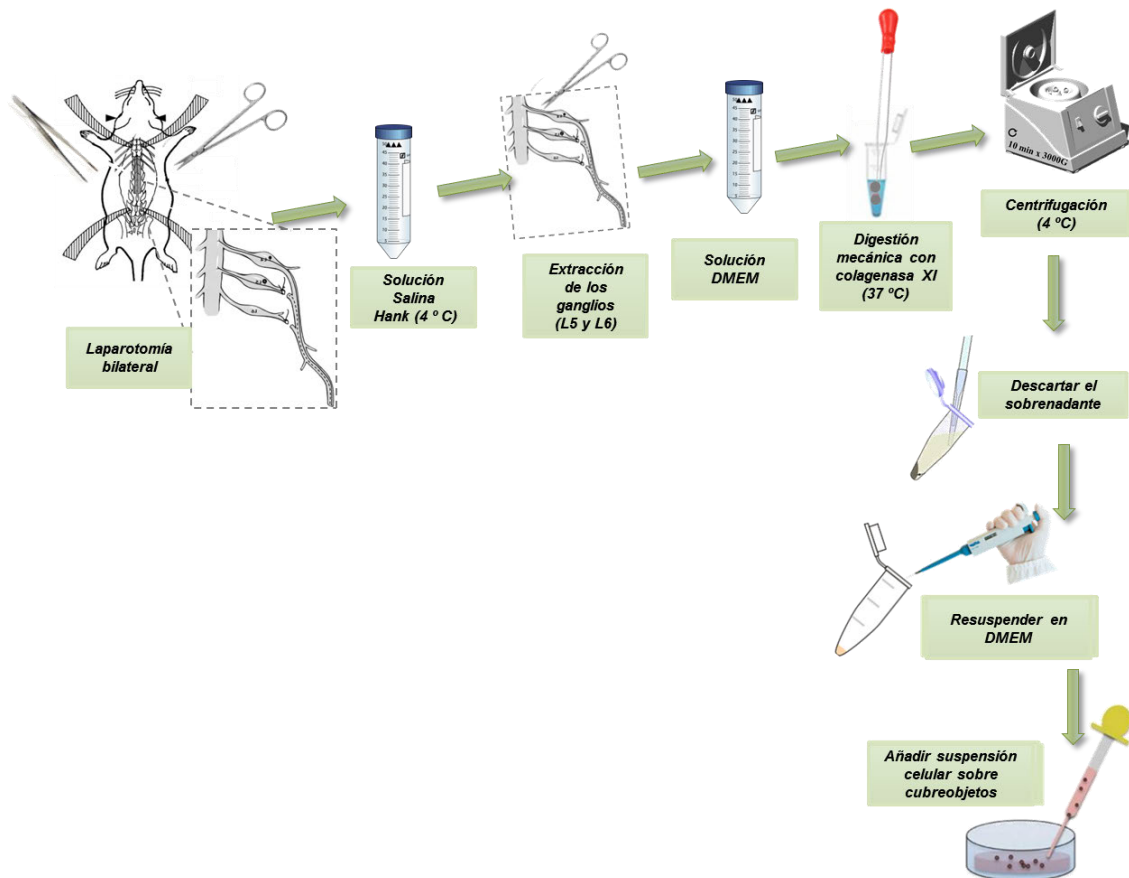


Figura 3.9. Cultivo de neuronas de los ganglios espinales (DRG) de la rata. De forma esquemática se muestra el procedimiento seguido para el cultivo de las neuronas de los ganglios espinales L5 y L6 de la columna vertebral hasta la siembra de las mismas y su alojamiento en una placa Petri (3-4 cubreobjetos por placa) de 35 mm de diámetro.

3.5.4. Inmunohistoquímica

Los estudios inmunohistoquímicos se realizaron en cortes de los ganglios espinales (L5 y L6) y de la glándula adrenal de ratas control y sometidas a la CCI del nervio ciático. Una vez sacrificados los animales, se procedió a la extracción y disección de los tejidos y a su fijación por inmersión en una mezcla de paraformaldehído (4% v/v) y ácido pícrico (0,2% v/v) en solución salina tamponada con fosfato (PBS; pH 6,9) durante 90 min a 4 °C (*Brumovsky et al., 2012a*). Posteriormente, las piezas de tejido fueron transferidas a una solución PBS (pH 7,4) durante 24 h adicionales. Se empleó un criostato HM 505E (Microm, Heidelberg, Alemania) para la obtención de cortes de $\approx 12 \mu\text{m}$ de espesor de ambas preparaciones. Todos los cortes fueron permeabilizados (Triton X-100 al 0,2% / albúmina sérica bovina; BSA al 2% en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente, previo lavado (BSA al 3% en PBS) y subsiguiente incubación durante toda la noche con anticuerpos primarios frente el receptor P2X3 (1:100; Alomone, Israel), TH (1:500; Synaptic systems, Alemania), o el transportador vesicular de ACh (VAChT, 1:50; Santa Cruz, España). Al día siguiente se lavaron las preparaciones con PBS y se procedió a su incubación durante 1 h con los anticuerpos secundarios correspondientes. Todas las secciones se trataron con DAPI para

identificar los perfiles nucleares de las células presentes en el tejido preservándose su fluorescencia con FluorSave™.

Las imágenes confocales fueron adquiridas con un microscopio DM IL de Leica Microsystems (Wetzlar, Alemania).

3.5.5. Preparación de cortes de glándula adrenal

Una vez extraídas las glándulas del animal, se mantuvieron a 4 °C en una solución salina (composición en mM: 125 NaCl, 2,5 KCl, 2 CaCl₂, 1 MgCl₂, 1,25 NaH₂PO₄, 26 NaHCO₃, y 12 glucosa; pH 7,4; \approx 300 mOsm) continuamente burbujeada con carbógeno (95% O₂/ 5% CO₂) hasta ser colocadas sobre un bloque de agar adherido a la platina de un vibratomo (Integralslice 7550 MM, Campden Instruments, Reino Unido) alojada en el interior de una cubeta llena de la solución salina mencionada. Las glándulas fueron seccionadas sagitalmente obteniéndose cortes de 300 μ m de espesor, que fueron empleadas durante las 6 h siguientes a su preparación.

3.5.6. Registros electrofisiológicos

La técnica de fijación de voltaje en parches de membrana o *patch-clamp* permite mantener de forma estable el potencial de toda la membrana de una célula (configuración de célula completa) o solamente la de una pequeña porción de la misma (configuraciones de parche adherido o escindido) y registrar la corriente generada por el flujo de iones a través de los canales localizados en la correspondiente membrana celular (modo de fijación de voltaje). Alternativamente, esta técnica también puede ser empleada para medir la modificación del potencial de membrana en respuesta a la inyección de pulsos de corriente (modo de fijación de corriente; *Hamill et al., 1981*). Si la corriente es fijada a 0 pA en la configuración de célula completa, el voltaje medido por el amplificador corresponderá al potencial de la célula en condiciones de “reposo” (V_r) o a sus modificaciones como consecuencia de cambios espontáneos en las conductancias iónicas de la membrana plasmática.

La técnica puede emplearse en cuatro configuraciones distintas (**Figura 3.10**)

1. Configuración de parche sobre célula entera o parche adherido (*on-cell patch*). Es la configuración que da nombre a la técnica y que obligatoriamente precede a todas las demás. Se alcanza cuando la micropipeta de vidrio (electrodo) entra en contacto con la membrana de la célula y la aplicación de presión negativa (5-20 mm de H₂O) en el interior de la pipeta da lugar a la formación de una unión (sello) de elevada resistencia mecánica y eléctrica (1 G Ω , “gigasello”) entre ambos elementos y, eventualmente, a la invaginación de una pequeña porción o parche de membrana en el interior de la pipeta (figura en omega). Permite registrar las

corrientes generadas por la activación de un número reducido de canales (1-10) en un parche de membrana.

2. Configuración de célula completa (*whole-cell*). Permite registrar la corriente iónica resultante de la actividad de los canales presentes en la práctica totalidad de la membrana celular. A ella se accede tras la aplicación de un pulso de succión o de voltaje que rompe el parche de membrana delimitado por el sello. Es la configuración utilizada en este trabajo.
3. Configuración de parche escindido interior hacia afuera (*inside-out patch*). En esta configuración la cara citosólica de un parche de membrana queda expuesta a la solución extracelular, mientras que la cara externa queda en contacto con la solución contenida en la pipeta de registro. La escisión del parche de membrana se produce al retirar la pipeta de vidrio y perder contacto con la superficie celular. Permite la rápida modificación de la solución en contacto con la cara interna de la membrana, favoreciendo el estudio de la modulación de la actividad de los canales iónicos por segundos mensajeros (Ca^{2+} , AMPc, etc.)
4. Configuración de parche escindido exterior hacia afuera (*outside-out patch*). Corresponde a la situación inversa a la del parche interior hacia afuera. A esta configuración se accede desde la configuración de célula completa al retirar la pipeta de vidrio.

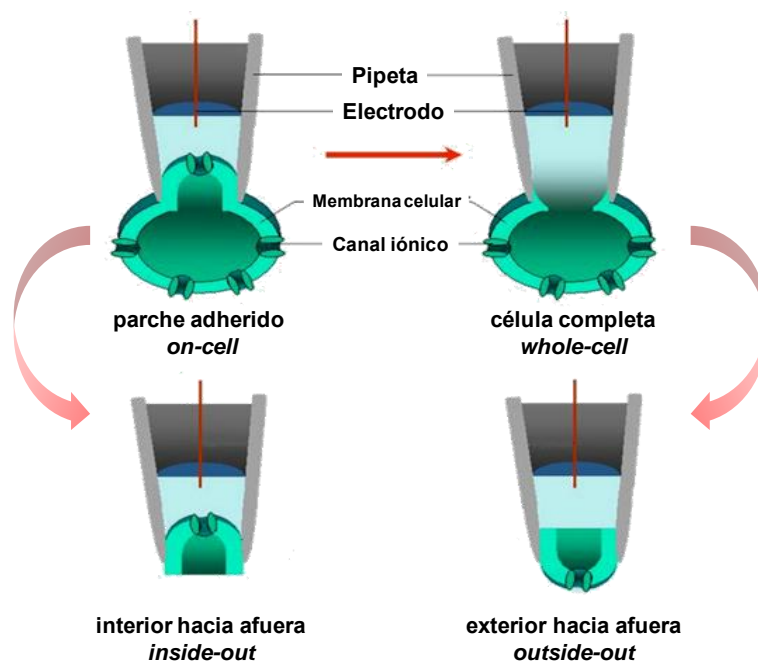


Figura 3.10. Configuraciones de la técnica de patch-clamp. La configuración de partida es la de parche adherido (*on-cell*), consistente en la formación de un sello de alta resistencia entre el borde de una pipeta de vidrio y la membrana celular. Cuando se aparta la pipeta de vidrio en la configuración *on-cell* y se pierde contacto con la superficie celular es posible escindir el fragmento de membrana delimitada por el sello (configuración de parche adherido interior hacia afuera; *inside-out*). Alternativamente, es posible aplicar un pulso de succión en el interior de la pipeta en la configuración *on-cell* al objeto de que se rompa el parche de membrana contenido en la pipeta y se establezca una continuidad eléctrica entre el interior celular y la pipeta característica de la configuración de célula completa (*whole-cell*). Desde esta configuración basta con retirar la pipeta de la célula para que se forme una vesícula membranosa en la que la superficie expuesta al medio extracelular corresponde a la cara externa de la membrana plasmática (configuración exterior hacia afuera; *outside-out*).

Las soluciones de registro (solución intracelular y extracelular) varían dependiendo del tipo y objetivos de experimento. Así, en los experimentos en los que se registraron las corrientes a través de los canales de Na_v y Ca_v , la composición de la solución intracelular fue (mM): CsCl 145, NaCl 8, HEPES 10, EGTA 10; MgCl_2 1, ATP. Na_2 2, GTP. Li_3 0,3; pH ajustado a 7,2 con CsOH (\approx 280 mOsm); para el registro de la actividad eléctrica (modalidad de fijación de corriente) y las medidas de capacidad celular (modalidad de fijación de voltaje) se modificó esta solución mediante la sustitución de CsCl por KCl y la disminución del EGTA a 0,3 mM.

3.5.6.1. Registro de corrientes iónicas en células cromafines aisladas y neuronas DRG de la rata

Los registros electrofisiológicos se realizaron con un amplificador de *patch-clamp* modelo EPC10 (HEKA Elektronik, Alemania) controlado desde un ordenador HP (xw4300 WorkStation) mediante el programa PatchMaster V2x65 (HEKA Elektronik, Alemania). Se emplearon micropipetas de vidrio fabricadas con un estirador vertical programable modelo PP830 (Narishige, Reino Unido) a partir de capilares de borosilicato con diámetros interno y externo de 1,5 y 1,8 mm, respectivamente (Gerresheimer, Alemania), quedando posteriormente almacenadas al reguardo de

la suciedad hasta el momento de su utilización en los registros. Una vez rellenas con la solución interna y sumergidas en la solución externa (véase más adelante), las pipetas presentaron una resistencia de 7,5 a 10,5 M Ω . Unos min antes del comienzo del experimento, tanto las células cromafines como las neuronas DRG, adheridas a cubreobjetos, fueron transferidas desde el incubador hasta una cámara de perfusión (DH-40iL, Warner Instruments, EE.UU) adaptada para la perfusión, que se situó sobre la platina del microscopio directo BX51WI (Olympus; Japón). Una vez allí, las células fueron superfundidas continuamente (2 mL/min) durante la totalidad del experimento con una solución salina a temperatura ambiente (22-26 °C).

Para el registro de las corrientes iónicas de la membrana celular se empleó la configuración de célula completa de la técnica de *patch-clamp* en la modalidad de fijación de voltaje, con monitorización continua de la capacidad de la membrana celular y de las Rs, que nunca excedieron los 15 M Ω . Salvo indicación en contra, el potencial de fijación (V_h) fue de -70 mV. En todos los protocolos que incluyeron cambios rápidos en el potencial de membrana se empleó el método P/n (P/4) para la sustracción automática de corrientes capacitivas y de fuga (*Bezanilla y Armstrong, 1977*).

El potencial de membrana de las células cromafines aisladas fue registrado en la modalidad de fijación de corriente inyectando la corriente (I_{comm}) adecuada para el registro de V_r ($I_{comm}=0$ pA) o para inducir el disparo de trenes de potenciales de acción. En este caso, el valor de I_{comm} variaba entre las distintas células en función, fundamentalmente, de la resistencia de la membrana de las mismas.

Las soluciones empleadas para el registro de las corrientes mediadas por nAChRs y el estudio de los receptores adrenérgicos tanto en células cromafines como en neuronas DRG en cultivo, así como, de las producidas a través de canales de Na⁺ y de K⁺ o del potencial de membrana de las células cromafines fueron las siguientes: solución extracelular (mM): NaCl 145, KCl 2,8, CaCl₂ 2, MgCl₂ 2, HEPES 10, glucosa 10; pH ajustado a 7,2 con HCl o NaOH (≈ 300 mOsm); solución intracelular (mM): KCl 140, EGTA 10, Na₂ ATP 2, Li₃ GTP 0,3, HEPES 10; pH ajustado a 7,4 con KOH (≈ 280 mOsm). En los experimentos en los que se registraron las corrientes a través de canales Ca_v de las células cromafines y neuronas DRG, la composición de la solución intracelular fue la siguiente (mM): ClCs 140, EGTA 10, ATP.Na₂ 2, GTP.Li₃ 0,3, HEPES 10; pH ajustado a 7,4 con CsOH (≈ 280 mOsm). Para el registro de la capacidad celular se utilizaron soluciones intracelulares con bajo EGTA (0, 3 mM). La solución extracelular se preparó diariamente en tanto que la intracelular semanalmente.

Las corrientes generadas fueron filtradas a 2 KHz y digitalizadas a 4 KHz para su posterior análisis y representación gráfica. Las medidas de la amplitud de las corrientes y de los cambios en el potencial de membrana se realizaron mediante los programas PatchMaster V2x65 y FitMaster

V2x60 (HEKA Elektronik, Alemania), mientras que para la representación del curso temporal de las respuestas a lo largo de los experimentos se empleó el programa Igor Pro 5.05 (WaveMetrics, EEUU).

3.5.6.2. Registro de corrientes iónicas en cortes de la glándula adrenal de la rata

En los registros electrofisiológicos en cortes de tejido adenomedular se empleó un microscopio directo BX51WI (Olympus, Japón) dotado de una cámara de perfusión (DH-40iL, Warner Instruments, EE.UU) en la que se colocaban los cortes de tejido sujetos mediante una rejilla de hilo de nylon, de fabricación doméstica, y un amplificador EPC10 (HEKA Elektronik, Alemania). Se utilizaron pipetas de borosilicato (1,5 mm de diámetro interno y 1,8 mm de diámetro externo) que presentaron resistencias de 7,5-10,5 M Ω una vez rellenas con la solución intracelular y sumergidas en la solución extracelular. La composición de la solución intracelular fue (mM): KCl 145, MgCl₂ 2, EGTA 0,3, GTP.Li₃ 0,3, ATP.Na₂ 2, HEPES 10; pH ajustado a 7,2 con KOH (\approx 280 mOsm). La solución extracelular, con que se perfundía continuamente sobre la preparación (2 mL/min), tuvo la siguiente composición (mM): NaCl 125, KCl 2,5, CaCl₂ 2, MgCl₂ 1, NaH₂PO₄ 1,25, NaHCO₃ 26, glucosa 12; pH ajustado a 7,4 mediante gasificación continua con carbógeno (\approx 300 mOsm).

El potencial de membrana de las células cromafines en cortes de tejido fue registrado bajo la modalidad de fijación de corriente de forma análoga a la descrita para las células cromafines aisladas, mientras que el registro de las EPSCs (espontáneas) así como de las corrientes inducidas por la administración de ACh exógena se realizó en la modalidad de fijación de voltaje a un V_h de -60 mV, con monitorización de la capacidad celular y de las Rs, que nunca excedieron los 20 m Ω . Las señales eléctricas fueron filtradas a 1 (voltaje) ó 3 (corriente) KHz y adquiridas a una frecuencia de 10 KHz en un ordenador HP xw4300 WorkStation mediante el programa PatchMaster V2x65 (HEKA Elektronik, Alemania).

3.5.7. Administración de fármacos en experimentos electrofisiológicos

Para la administración de fármacos en las preparaciones de cortes de la glándula adrenal se empleó un dispositivo de eyección neumática de doble canal PDES-02DX (npi electronic, Alemania). La salida del sistema consistía en una pipeta de borosilicato rellena con una disolución del fármaco, que era expulsada sobre la célula objeto de estudio situada a 10 μ m de la punta (2-4 μ m de diámetro) de la pipeta. La administración del fármaco se realizaba mediante la administración de pulsos de presión (0,2-0,5 bar) de 50-500 ms (fármacos agonistas) ó 2-5 min (fármacos antagonistas) bajo el control del programa PatchMaster v2x65 (HEKA Elektronik, Alemania). Ocasionalmente, la administración de fármacos se realizó mediante la incorporación de los mismos al sistema de perfusión del baño.

La estimulación con los fármacos agonistas se realizó mediante pulsos breves (50-500 ms) administrados tres veces consecutivas a intervalos de 45 s, calculándose posteriormente la media de las respuestas obtenidas (pulsos 1º, 2º y 3º). El efecto de los fármacos antagonistas se evaluó tras la incubación de las células durante 2-3 min antes de ser coaplicado un pulso del agonista con el antagonista (pulsos 4º, 5º y 6º).

Las disoluciones de los fármacos en la solución extracelular se prepararon diariamente a partir de soluciones acuosas concentradas (10^{-1} - 10^{-3} M) de los mismos. La proporción de volumen de esta solución concentrada en la solución extracelular fue siempre inferior al 1%.

3.6. Análisis de datos y pruebas de significación estadística

El efecto de los fármacos sobre la alodinia mecánica o al frío, medidas respectivamente mediante el umbral de retirada —UR— o el tiempo de respuesta —TR—, se expresó como porcentaje del efecto máximo posible (% EMP) de acuerdo a la siguiente fórmula (*Park et al., 2012*):

Alodinia mecánica

$$\% \text{ EMP} = \frac{\text{UR con fármaco post CCI} - \text{UR con vehículo post CCI}}{\text{UR máximo (50 g)} - \text{UR con vehículo post CCI}} \times 100$$

Alodinia térmica

$$\% \text{ EMP} = \frac{\text{TR con fármaco post CCI} - \text{TR pre CCI}}{\text{TR con vehículo post CCI} - \text{TR pre CCI}} \times 100$$

El análisis de las corrientes registradas en experimentos electrofisiológicos se realizó con el programa FitMaster V2x60 (HEKA Elektronik, Alemania), determinándose la amplitud (función *Minimum*) y la carga (Q; función *Integral*) de las mismas. Las medidas de la capacidad celular se realizaron mediante la función *Mean* aplicada a los registros correspondientes. El incremento de la capacidad se calculó mediante la sustracción de los valores obtenidos tras la administración de un estímulo secretor (pulso despolarizante o ACh) de los registrados previamente al mismo.

Para la elaboración de curvas dosis-respuesta y la obtención de los valores de la concentración/dosis inhibidora 50 (CI₅₀; DE₅₀) se ajustó una función de Hill a los datos normalizados. Se empleó el programa Igor Pro 5.05 (Wavemetrics, EEUU) para la representación de los registros electrofisiológicos y el programa GraphPad Prism v.5.0 (GraphPad Software Inc., EEUU) para el análisis y representación de los datos del resto de los experimentos.

Los resultados aparecen expresados como media \pm error estándar de la media (S.E.M.) de un determinado número (n) de experimentos, valoraciones o animales.

Al objeto de comparar las diferencias existentes entre tratamientos/condiciones (control o CCI) a tiempos diferentes se empleó un análisis de la varianza (ANOVA) de dos vías para medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para la determinación de la significación estadística de las diferencias entre dos tratamientos/condiciones a tiempos coincidentes (Nirogi *et al.*, 2012). La evaluación de la significación estadística del efecto de una intervención (7 días después de CCI; administración de un fármaco) con respecto al valor basal (1 día antes de CCI) o a la administración de vehículo se realizó mediante la prueba *t* de *Student* para muestras pareadas. En los estudios en los que distintos grupos de animales pertenecientes a la misma condición fueron sometidos a tratamientos con distintos fármacos fueron, la significación estadística se analizó mediante la prueba ANOVA de una vía seguida de un test de Newman-Keuls.

La significación estadística de los datos relativos a la cuantificación de CAs y los resultados electrofisiológicos se realizó mediante la prueba *t* de *Student*, para muestras, según el caso, pareadas o no pareadas. En aquellos experimentos en los que se utilizaron valores normalizados, la significación estadística se determinó mediante la prueba *t* de *Student* para una sola muestra.

En todos los casos, los niveles de significación establecidos fueron $P < 0,001$ (***), $P < 0,01$ (**) y $P < 0,05$ (*).

IV. RESULTADOS

“Detrás de cada cosa hermosa, hay algún tipo de dolor”

Bob Dylan

4.1. Implementación de la CCI del nervio ciático de la rata como modelo de dolor neuropático

Para el desarrollo de nuestros objetivos implementamos la constricción crónica (CCI) del nervio ciático de la rata como modelo de dolor neuropático (Bennett y Xie, 1988). La principal característica de este modelo es la de producir modificaciones en la sensibilidad nociceptiva con una mínima concurrencia de alteraciones motoras. En línea con lo descrito en la literatura, las alteraciones sensitivas fueron evidentes a los 7 días de la intervención y se mantuvieron estables a lo largo del tiempo (un mínimo de 2 semanas, 7-21 días postcirugía; Hong-Ju *et al.*, 2004; De Vry *et al.*, 2004; Vissers y Meert, 2005; Hama y Borsook, 2005; Pradhan *et al.*, 2010). Las alteraciones características de la nocicepción asociadas a este modelo son la hiperalgesia y la alodinia mecánicas y la alodinia al frío (Lintao *et al.*, 2011). Por ello, en este trabajo hemos empleado con carácter general el test de Von Frey automatizado y el test de la acetona para la valoración, respectivamente, de la alodinia mecánica y térmica (frío) en tres grupos de animales: control, *Sham* y CCI.

4.1.1. Modificaciones en el comportamiento nocifensivo: alodinia mecánica y al frío, e hiperalgesia mecánica

Las respuestas control a lo largo del período de evaluación se determinaron tanto en la extremidad contralateral de los animales CCI ($31,98 \pm 1,35$ g, correspondiente a la media de tres determinaciones realizadas en la pata contraria a la lesión a lo largo de la semana anterior a la cirugía; respuesta basal (-1); $33,24 \pm 1,01$; $32,99 \pm 1,21$ y $33,46 \pm 1,16$ g para los días 7, 14 y 21 postcirugía, respectivamente; $n = 16-20$ ratas) como en la pata trasera derecha de los animales control ($31,63 \pm 1,47$ g; $33,01 \pm 1,38$; $32,88 \pm 1,89$ y $31,24 \pm 1,45$ g para los días -1, 7, 14 y 21, respectivamente; $n = 20-25$ ratas) y la ipsilateral de los animales *Sham* (pata del mismo lado de la intervención; $28,82 \pm 2,80$ g; $27,64 \pm 3,01$; $30,58 \pm 3,21$ y $34,83 \pm 5,16$ g para los días -1, 7, 14 y 21 postcirugía; $n = 5$ ratas). Estas respuestas no presentaron modificaciones ni diferencias significativas entre los tres grupos evaluados a lo largo del tiempo de estudio validando así la utilización de la extremidad contralateral de los animales CCI como control, lo que ha permitido reducir el número de animales empleados en los procedimientos experimentales (**Figura 4.1A**). De la misma forma que para la alodinia mecánica, se procedió a registrar las respuestas control para la alodinia al frío, constatándose que las respuestas son estables y muy bajas (próximas a 0 s) y, además, no presentaron modificaciones a lo largo de las semanas de evaluación en los mismos grupos de animales y extremidades en los que se valoró la alodinia mecánica (**Figura 4.1B**).

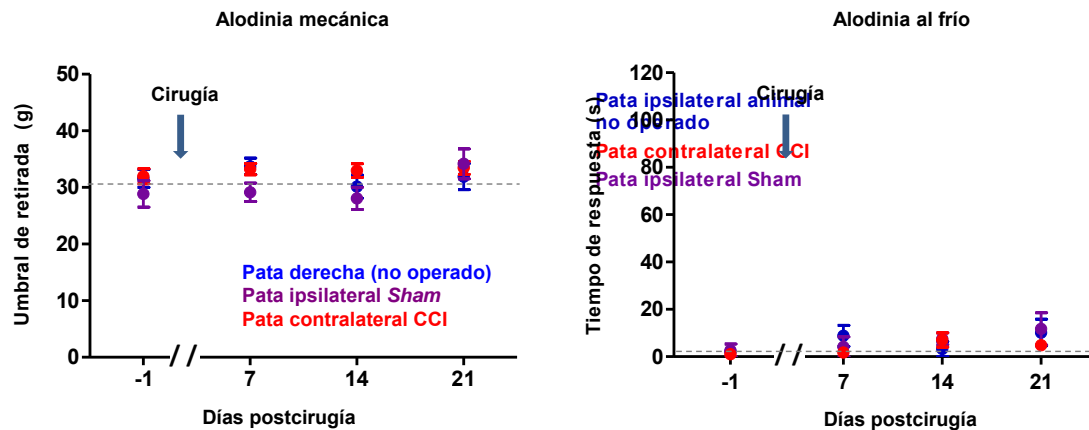


Figura 4.1. Evaluación comportamental en grupos control de la alodinia mecánica y al frío. Se evaluó la alodinia mecánica (*panel izquierdo*) y al frío (*panel derecho*) en tres grupos de animales: **no operados** (pata trasera derecha), **Sham** (pata ipsilateral) y **CCI** (pata contralateral). Para obtener la respuesta basal (día -1) se ha utilizado la media de tres valoraciones realizadas a lo largo de la semana anterior a la cirugía. En los animales operados, la evaluación comportamental se reinició a los 7 días postcirugía y se continuó durante las dos semanas siguientes. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental ($n = 5-25$ animales en cada grupo). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de dos vías para medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones entre condiciones en tiempos coincidentes.

La respuesta experimental se evaluó, en la pata ipsilateral a la lesión en los animales CCI registrándose un umbral de retirada al estímulo mecánico de $32,50 \pm 1,11$ g antes de la intervención (-1), que disminuyó hasta valores de $18,17 \pm 0,90$ g (reducción del $41 \pm 4\%$); $14,86 \pm 0,72$ g (reducción del $52 \pm 4\%$) y $16,54 \pm 0,61$ g (reducción del $47 \pm 3\%$) los días 7, 14 y 21 después de la cirugía, respectivamente ($n = 16-20$ ratas). Nuestros resultados son indicativos de un incremento ($P < 0,001$; con respecto a la correspondiente respuesta control) de la sensibilidad mecánica en la extremidad ipsilateral a la lesión nerviosa (Cui *et al.*, 1996; Ramer y Bisby, 1997; Sawin *et al.*, 1997; **Figura 4.2A**).

Análogamente, se realizó la valoración de la sensibilidad al frío. Los animales CCI mostraron una respuesta a la administración de acetona de $8,57 \pm 2,68$ s de duración antes de la intervención que alcanzó valores de $79,18 \pm 5,75$ s; $63,31 \pm 5,72$ s y $58,61 \pm 6,55$ s para los días 7, 14 y 21 postcirugía, respectivamente ($n = 16-20$ ratas, $P < 0,001$; con respecto a la correspondiente respuesta control; **Figura 4.2B**). En contraste con el curso temporal de la alodinia mecánica, la alodinia al frío fue disminuyendo a partir de la primera semana postcirugía, lo que sugiere la participación de distintas fibras nerviosas en ambos procesos.

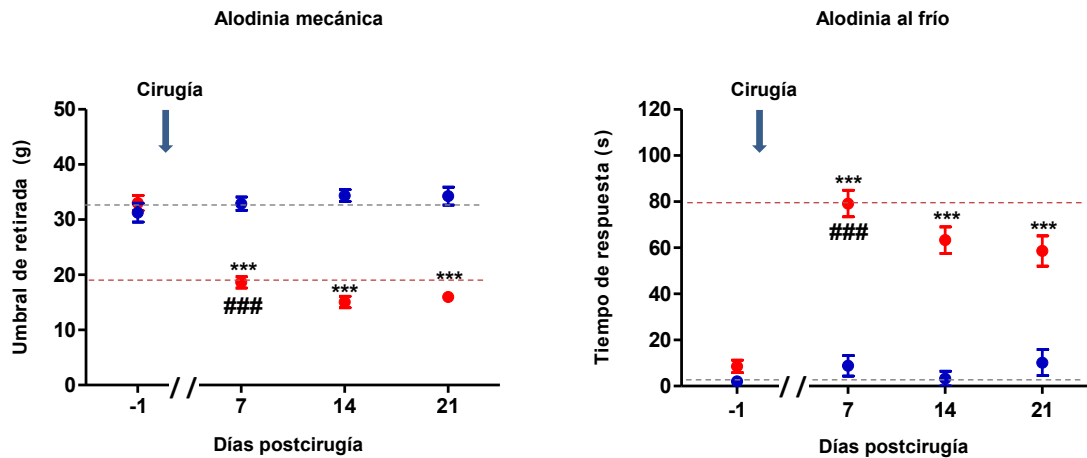


Figura 4.2. Evaluación comportamental en animales CCI de la alodinia mecánica y al frío. Se evaluó la pata **ipsilateral** y la pata **contralateral** a la CCI con respecto a la alodinia mecánica (*panel izquierdo*) y al frío (*panel derecho*). Para obtener la respuesta basal (día -1) se realizaron tres valoraciones a lo largo de la semana anterior a la cirugía. La evaluación comportamental se reinició a los 7 días postcirugía y se continuó durante las dos semanas siguientes. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental ($n = 16-20$ ratas). El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de dos vías para medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones entre las respuestas en tiempos coincidentes (***: $P < 0,001$). La significación estadística del efecto de la intervención (7 días después de CCI) con respecto a la respuesta basal (1 día antes de CCI; -1) se evaluó mediante una prueba *t* de Student para muestras pareadas (###: $P < 0,001$).

La existencia de hiperalgesia mecánica se determinó mediante el test de *Randall-Selitto* (1957), consistente en la aplicación de presión en el dorso de la pata trasera con una pieza cónica de metacrilato. Las valoraciones se realizaron antes de la intervención (respuesta basal; -1) y después de la misma (7-21 días). La respuesta basal determinada en la pata derecha de los animales control ($153,40 \pm 10,51$ g; correspondiente a la media de tres determinaciones realizadas en la pata contraria a la lesión a lo largo de la semana anterior a la cirugía; respuesta basal (-1); $175,42 \pm 15,53$; $173,39 \pm 14,05$ y $200,61 \pm 11,86$ g los días 7, 14 y 21; respectivamente, $n = 13$ ratas) se mostró elevada a lo largo del tiempo, en contraste con la disminución del umbral de retirada en la extremidad ipsilateral a la lesión de los animales CCI (de $151,43 \pm 11,52$ g antes de la intervención (-1), que disminuyó hasta valores de $69,41 \pm 8,86$ g (reducción del $51 \pm 5\%$); $66,83 \pm 9,78$ g (reducción del $49 \pm 7\%$) y $92,04 \pm 12,85$ g (reducción del $34 \pm 9\%$) los días 7, 14 y 21 después de la cirugía, respectivamente, $n = 17$ ratas; **Figura 4.3**). El curso temporal y magnitud relativa de la hiperalgesia mecánica fue similar al observado para la alodinia mecánica por lo que se decidió recurrir en los restantes experimentos de este trabajo a la evaluación de esta última dado su menor potencial estresante de los animales.

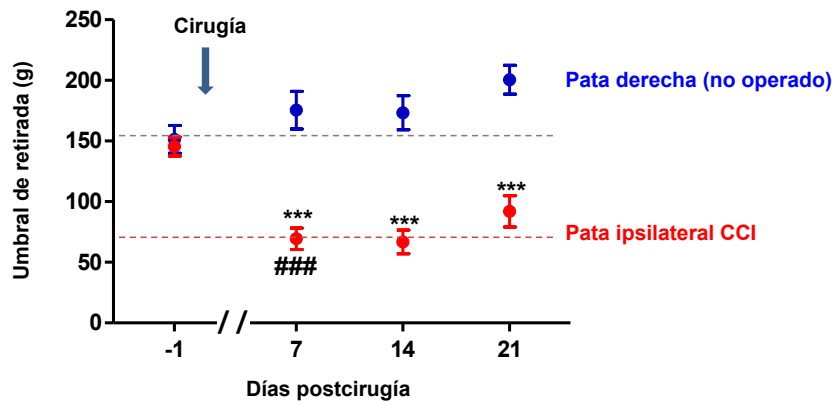


Figura 4.3. Evaluación de la hiperalgesia mecánica en animales control (no operados) y CCI. Se evaluó la hiperalgesia mecánica en la pata derecha de los animales **control** (no operados, $n = 13$) y la ipsilateral de los animales **CCI** ($n = 17$). Para obtener la respuesta basal (día -1) se realizaron tres valoraciones a lo largo de la semana anterior a la cirugía, la evaluación comportamental se reinició 7 días postcirugía y se repitió durante las dos semanas siguientes. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones entre las respuestas en tiempos coincidentes (***: $P < 0,001$). La significación estadística del efecto de la intervención (7 días después de CCI) con respecto a la respuesta basal (1 día antes de CCI; -1) se evaluó mediante una prueba t de Student para muestras pareadas (###: $P < 0,001$).

4.1.2. Modificaciones en la estructura de los ganglios espinales (DRG) y en la expresión de receptores purinérgicos P2X3

Se ha descrito que la lesión nerviosa puede inducir cambios en la expresión de receptores y en la morfología de los ganglios espinales (*Guda et al., 2016*). Entre los primeros es bien conocida la regulación al alza de los receptores purinérgicos P2X3 de localización neuronal, y entre los segundos la aparición de fibras nerviosas con inmunorreactividad para la TH, la enzima que cataliza la primera etapa de la biosíntesis de CAs (*Xiang et al., 2008; Jarvis, 2010; Pradhan et al., 2010*).

En nuestro modelo de dolor neuropático, pudimos mediante el empleo de técnicas inmunohistoquímicas confirmar la existencia de ambos fenómenos. Los ganglios espinales, son estructuras con una importante heterogeneidad en relación a los tipos de neuronas cuyos somas albergan así como respecto a las fibras nerviosas (mielínicas y amielínicas) que los surcan. Ello deriva de las muy diferentes modalidades sensitivas (mecánica, térmica, dolorosa) cuya información transmiten y procesan. En los ganglios sensitivos existen dos formas de neuroglía: las células satélite, que envuelven los somas neuronales, y las células de Schwann, que revisten los axones (fibras nerviosas) de las mismas (*Hanani, 2005*). Las células satélite cumplen una función similar a la de los astrocitos en el SNS participando en la transmisión de información en el ganglio (sinapsis en sándwich; *Rozanski et al., 2013*). Desde el punto de vista neuroquímico, las células satélite expresan inmunorreactividad para la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP), lo que permite visualizarlas como los tabiques de un panal cuyas celdas estarían ocupadas por los somas

de las neuronas DRG. Como se muestra en la **Figura 4.4**, en el ganglio L5 de animales CCI se ve incrementada la inmunorreactividad para el receptor P2X3 en las neuronas DRG (nótese la ausencia de colocalización con GFAP) al tiempo que se observan tractos positivos para la TH, indicativos de la infiltración de fibras nerviosas catecolaminérgicas.

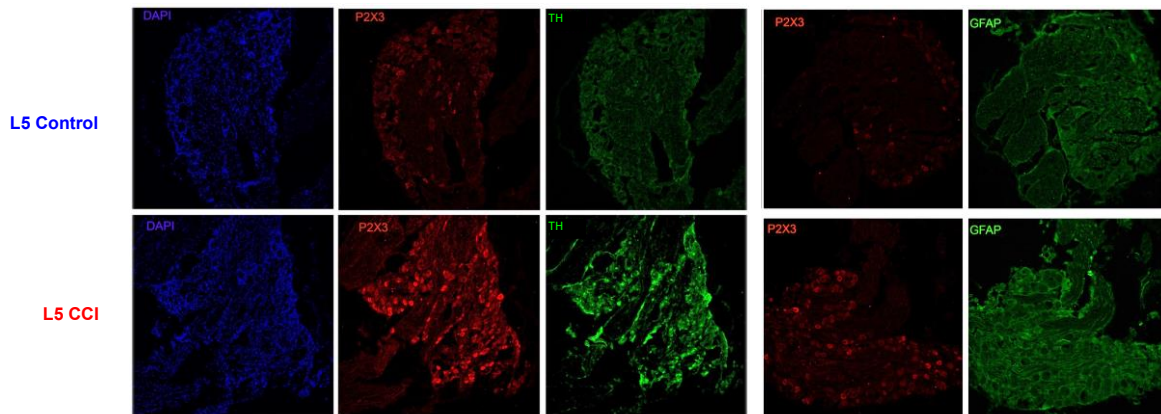


Figura 4.4. Cambios inmunohistoquímicos en los ganglios espinales (L5) inducidos por la CCI del nervio ciático de la rata. Imágenes de microscopía confocal representativas de un corte de un ganglio espinal donde se observan los núcleos de las células gliales y neuronas DRG (DAPI), la presencia de receptores P2X3 neuronales y las fibras catecolaminérgicas (TH) en **Control** (panel superior) y **CCI** (panel inferior). Resulta evidente el aumento de la inmunorreactividad de los receptores P2X3 y de TH en los ganglios de los animales CCI. En la parte derecha de la figura se observa la imagen de otro corte en el que se evidencia la ausencia de colocalización para la inmunoreactividad registrada para los receptores P2X3 y la proteína ácida fibrilar de la glía (GFAP). Los resultados mostrados son representativos de los obtenidos en preparaciones distintas procedentes de animales control y CCI (n = 3 ratas para cada grupo experimental).

4.2. La CCI del nervio ciático de la rata como modelo de estrés

4.2.1. Efectos sobre el estado metabólico y el tamaño de las glándulas adrenales de los animales

La evaluación fisiológica (balance metabólico) y bioquímica de los animales con dolor neuropático se centró en la determinación de su peso corporal así como en la valoración del tamaño y contenido en CAs de las glándulas adrenales, como indicadores de una respuesta de estrés relacionada con la activación del SNS. Además, en la valoración de estos indicadores se utilizó como control positivo un grupo de animales estresados por frío. Las curvas de peso de los animales *Sham* (peso al ingreso: $199,31 \pm 1,25$ g; n = 5) y de los CCI (peso al ingreso: $207,58 \pm 7,46$ g; n = 22) no presentaron diferencias significativas durante las 4 semanas siguientes al ingreso que incluyeron las 3 semanas posteriores a la intervención (**Figura 4.5**). Debemos destacar, no obstante, que hasta el día 3 postcirugía se observó una ligera caída del crecimiento en el peso en el grupo de animales CCI (ganancia de $\approx 3\%$) en comparación a los animales *Sham* (ganancia de $\approx 6,5\%$) que se recuperó rápidamente en los días siguientes, lo que de acuerdo con algunos autores sería un indicador de bienestar animal a pesar de la lesión infligida (Bolaños *et al.*, 2013).

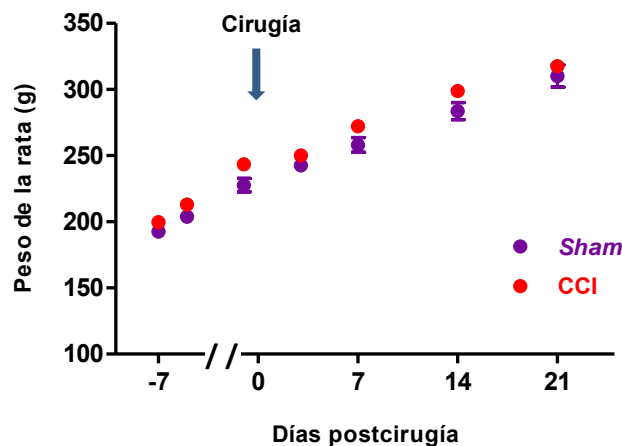


Figura 4.5. Efecto de la CCI del nervio ciático sobre el peso corporal de los animales. Curva ponderal de los animales *Sham* (n = 5 ratas) y *CCI* (n = 22 ratas) desde su ingreso (día -7) hasta la finalización de los estudios comportamentales (días -5, -1, 3, 7, 14 y 21). El día 0 corresponde al de la cirugía. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de dos vías para medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para la comparación entre los dos grupos de animales ($P > 0,05$).

Así mismo, el peso de los animales sometidos al protocolo de estrés por frío fue de $225 \pm 4,3$ g y de $216 \pm 3,6$ g, antes y después, respectivamente, de la exposición a dicho estresor ($P < 0,001$; n = 31). Ello supone un descenso del $4,1 \pm 0,8\%$ en el peso de los animales estresados, lo que contrasta con el aumento del $17,4 \pm 0,6\%$ observado en ratas control, no sometidas a este tipo de estrés (desde $207,81 \pm 3,42$ g hasta $251,53 \pm 3,27$ g; $P < 0,0001$; n = 75).

Por otra parte, el peso de las glándulas adrenales de los animales CCI, fue de $25,10 \pm 0,79$ mg (glándula derecha) y $26,30 \pm 0,99$ mg (glándula izquierda, n = 23 pares de glándulas) no mostró diferencias con sus controles (*Sham*), que fueron de $25,18 \pm 1,01$ mg (glándula derecha) y $26,75 \pm 1,02$ mg (glándula izquierda; n = 4 pares de glándulas, $P > 0,05$). En relación con los animales estresados por frío, los valores obtenidos para el peso de las glándulas adrenales (n = 22 pares) fueron de $27,74 \pm 1,16$ mg (glándula derecha) y $26,71 \pm 1,24$ mg (glándula izquierda), que para ambas glándulas fueron significativamente mayores ($P < 0,001$) que los registrados en glándulas procedentes de animales control (n = 21 pares de glándulas; $21,26 \pm 0,77$ mg y $22,17 \pm 0,82$ mg, para las glándulas derecha e izquierda, respectivamente). No se observaron diferencias significativas entre las glándulas procedentes del lado derecho y las del lado izquierdo en todos los grupos de animales. Consiguientemente, en la **Figura 4.6** se representan los datos de los pesos de las glándulas derechas procedentes de los distintos grupos experimentales.

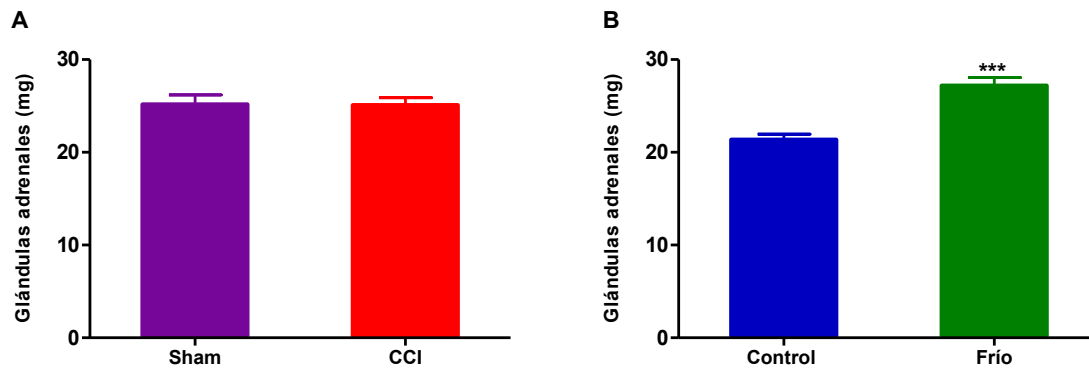


Figura 4.6. Efecto de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío sobre el peso de las glándulas adrenales. **A.** Diagrama de barras del peso de las glándulas adrenales derechas de los animales *Sham* (n = 4 glándulas) y *CCI* (n = 23 glándulas). **B.** Diagrama de barras del peso de las glándulas adrenales de los animales *Control* (n = 21 glándulas) y los animales estresados por *Frío* (n = 22 glándulas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental, habiéndose estimado la significación estadística mediante una prueba *t* de *Student* para muestras no pareadas respecto a sus respectivos controles. ***: $P < 0,001$.

4.2.2. Efecto sobre el contenido adrenoglandular y los niveles circulantes de CAs

El contenido en CAs se determinó en glándulas procedentes de animales sacrificados mediante concusión seguida de decapitación. Como se mencionó en el apartado de Materiales y Métodos, una de las glándulas adrenales (la derecha) se empleó en estudios de índole electrofisiológico mientras que la otra (la izquierda) se utilizó para el análisis de CAs (A y NA), habiendo constatado previamente la inexistencia de diferencias en el contenido de CAs entre ambas glándulas (izquierda y derecha) en los distintos grupos de animales (datos no mostrados).

El contenido en A y NA de las glándulas adrenales de los animales CCI fue de $9,75 \pm 0,44$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$ y $1,39 \pm 0,10$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$, respectivamente (n = 13), mientras que en sus controles, los animales *Sham*, los valores obtenidos fueron de $13,58 \pm 1,26$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$ y $2,09 \pm 0,37$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$, respectivamente para el contenido de A y NA (n = 4). En los animales control los valores registrados fueron de $10,39 \pm 1,43$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$ y de $1,84 \pm 0,29$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$, respectivamente (n = 12) mientras que en los animales estresados por frío el contenido de dichas CAs fue de $7,98 \pm 0,62$ y $1,16 \pm 0,08$ $\mu\text{g}/\text{glándula}$, respectivamente para A y NA (n = 10; **Figura 4.7**).

Los resultados obtenidos en los distintos grupos de animales son consistentes con el predominio de las células adrenérgicas en la médula adrenal de la rata (*Wood y Barnett, 1964; Coupland et al., 1964; Goldstein et al., 1971*).

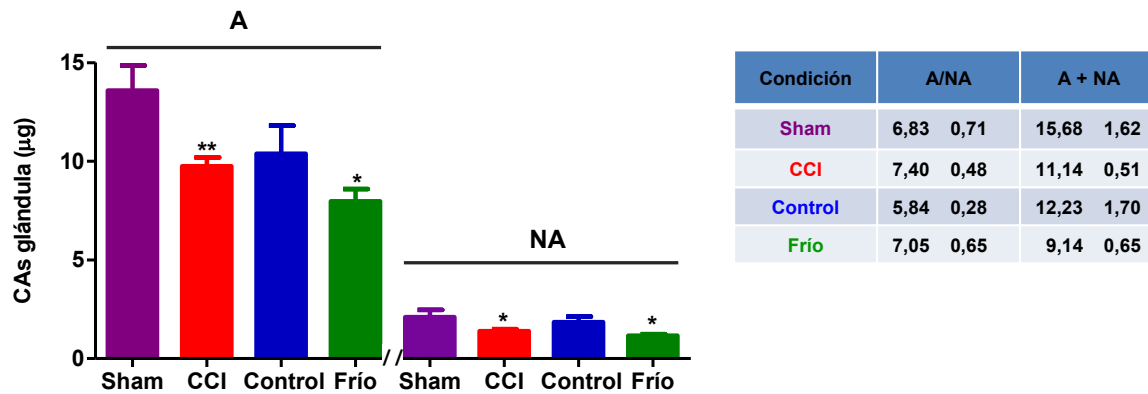


Figura 4.7. Efectos de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío en el contenido de catecolaminas de la glándula adrenal. Panel izquierdo. Diagramas de barras del contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de glándulas adrenales de ratas Sham (n = 4 ratas), CCI (n = 13 ratas), Control (n = 12 ratas) y estresadas por Frío (n = 10 ratas). Panel derecho. Se muestra en forma de tabla el ratio A-NA (A/NA) y las CAs totales (A+NA) para las distintas condiciones experimentales. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. La significación estadística se estimó mediante una prueba *t* de Student para muestras no pareadas. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; con respecto a sus controles.

En una primera serie de experimentos se procedió a la extracción de sangre de la vena lateral de la cola de la rata bajo anestesia con isoflurano al objeto de determinar los niveles plasmáticos de CAs en condiciones basales (ausencia de estrés). En los animales CCI los niveles de CAs circulantes en muestras obtenidas el día 7 tras la cirugía ($0,52 \pm 0,11$ ng/mL de A y $1,01 \pm 0,11$ ng/mL de NA, n = 20) no difirieron significativamente de lo registrado en los mismos animales antes de la cirugía (control basal, día -1; $0,58 \pm 0,13$ ng/mL de A y $1,08 \pm 0,12$ ng/mL de NA, n = 20; **Figura 4.8**). Los valores de las concentraciones plasmáticas basales de NA fueron superiores a los de A, lo que sugiere una mínima activación del sistema simpatoadrenomedular en esas condiciones.

Sin embargo, la médula adrenal contribuye a la elevación de las CAs plasmáticas en respuesta a muy distintas formas de estrés agudo de elevada intensidad como el asociado con el sacrificio del animal mediante concusión y posterior decapitación (Kvetnansky *et al.*, 1978). Dicha respuesta probablemente acompañe al dolor espontáneo y a la alodinia mecánica características del dolor neuropático al tiempo que refleje los cambios en la función SNS durante el estrés crónico.

Así, en los animales control sacrificados por concusión-decapitación (sin anestesia) se observó un aumento dramático de los niveles de CAs plasmáticas ($5,28 \pm 1,64$ ng/mL de A y $4,01 \pm 0,48$ ng/mL de NA, n = 7) y una inversión del ratio A-NA, respecto a lo observado en animales anestesiados (**Figura 4.9**). En los animales CCI ($7,32 \pm 2,24$ ng/mL de A y $3,52 \pm 0,91$ ng/mL de NA, n = 6) y en los sometidos a estrés por frío ($8,40 \pm 1,18$ ng/mL de A y $5,22 \pm 0,83$ ng/mL de NA, n = 16) la respuesta al estrés por decapitación fue cualitativamente similar a la observada en el grupo Control, mostrando no obstante un mayor incremento del ratio A-NA en los animales CCI.

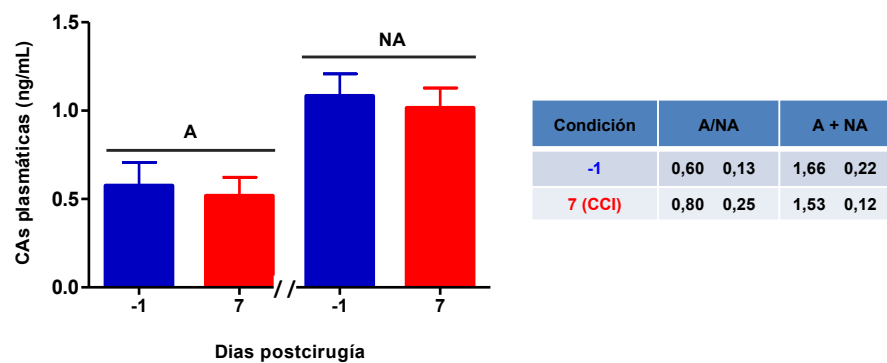


Figura 4.8. Efecto de la CCI del nervio ciático sobre los niveles plasmáticos de CAs en animales anestesiados. *Panel izquierdo.* Diagrama de barras de los niveles plasmáticos de CAs, (A y NA) en un grupo de animales CCI antes (-1; control basal) y después de haber sido sometidos a la cirugía (CCI; día 7). *Panel derecho.* Se muestran en forma de tabla el ratio A-NA (A/NA) y las CAs totales (A+NA) en los animales CCI antes (-1) y después (7) de la lesión nerviosa. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo de determinaciones. La significación estadística se estimó mediante una prueba *t* de Student para muestras pareadas.

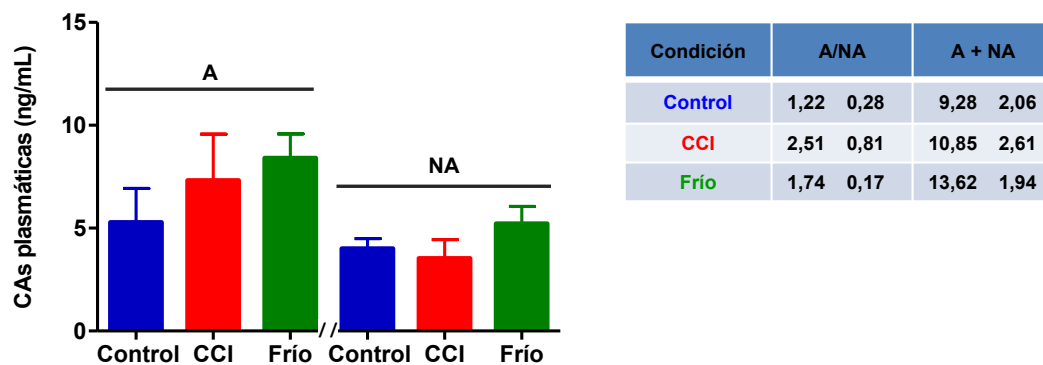


Figura 4.9. Efecto de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío sobre los niveles plasmáticos de CAs en animales sacrificados por concusión. *Panel izquierdo.* Diagrama de barras de los niveles plasmáticos de CAs, (A y NA) en los grupos de animales Control (n = 7 ratas), CCI (n = 6 ratas) y Frío (n = 16 ratas). *Panel derecho.* Se muestran en forma de tabla el ratio A-NA (A/NA) y las CAs totales (A+NA) en los animales Control, CCI y Frío. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo de determinaciones. La significación estadística se estimó mediante una prueba *t* de Student para muestras no pareadas.

4.2.3. Efecto sobre el patrón de innervación de las células cromafines y la transmisión en la sinapsis esplacno-cromafín

La posible activación del eje simpatoadrenomedular en nuestro modelo experimental y las evidencias que implican al SNS en la génesis y fisiopatología de dolor neuropático motivaron que investigásemos la existencia de cambios funcionales en las células cromafines de la médula adrenal. Para ello recurrimos a la técnica de *patch-clamp* alternando las modalidades de fijación de voltaje (para la medida de corrientes iónicas y la capacidad) y de corriente (para la medida de los cambios en el potencial de membrana).

Se ha descrito que la transmisión sináptica entre las terminaciones del nervio esplácnico y las células cromafines de la médula adrenal de la rata está aumentada en condiciones de estrés por

frío (Guerineau y Desarmenien, 2010), lo que se manifiesta por un mayor número de células que presentan sEPSCs (22% en cortes de la glándula adrenal de animales estresados vs 6% en glándulas procedentes de animales control) así como por una mayor frecuencia de éstos en cada célula ($0,12 \pm 0,01$ Hz en animales estresados vs $0,04 \pm 0,01$ Hz en animales control, Colomer y col., 2010) probablemente como consecuencia de la profunda remodelación del tejido adrenomedular y, en particular, del aumento de la innervación colinérgica que ocurre durante el estrés crónico (Colomer y col., 2008a). En cortes de tejido adrenoglandular procedentes de animales CCI también se evidenció una mayor frecuencia de sEPSCs ($0,13 \pm 0,03$ Hz vs $0,02 \pm 0,01$ Hz para CCI, $n = 3$ células y control, $n = 6$ células; **Figura 4.10**) y a través de estudios de inmunohistoquímica se mostró un aumento de la inmunorreactividad al transportador vesicular de ACh.

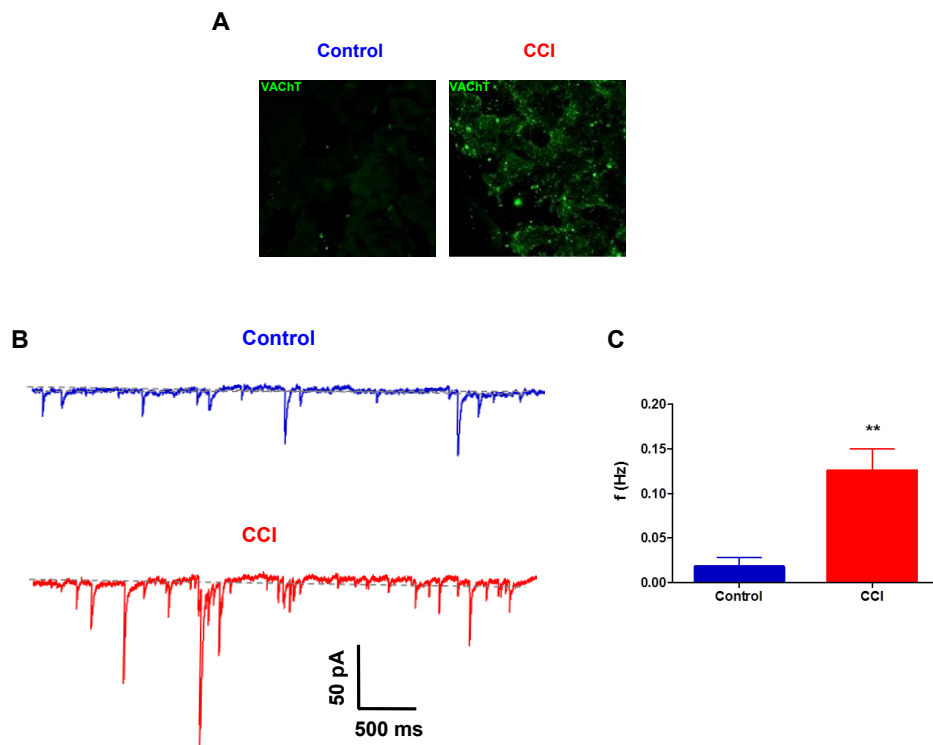


Figura 4.10. Registro de corrientes postsinápticas excitadoras espontáneas (sEPSCs) en células cromafines en cortes de la glándula adrenal de animales control y CCI. A. Imagen de inmunohistoquímica en cortes de glándula adrenal en las que se observa un aumento de la inmunoreactividad al transportador vesicular de ACh (VACHT) de las CCI respecto al Control. B. Registros representativos del incremento de la frecuencia de sEPSCs en las células de los animales CCI ($n = 3$ células) respecto a las del grupo Control ($n = 6$ células); $V_h = -60$ mV. C. Diagrama de barras de la frecuencia (f) de las sEPSCs registrada en las células de ambos grupos experimentales. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M., habiéndose estimado la significación estadística respecto al grupo control mediante una prueba *t* de Student para muestras no pareadas. **: $P < 0,01$.

4.2.4. Efectos sobre los nAChR, las conductancias iónicas dependientes de voltaje y la respuesta excitotóxica de las células cromafines de la médula adrenal

La aplicación de un pulso de ACh (100 μ M, 50 ms) en células cromafines aisladas nos permitió el registro de corrientes nicotínicas que tanto en los animales CCI como en los estresados por frío mostraron un incremento de la amplitud (590 ± 24 pA, $n = 44$ células, 15 ratas y 596 ± 25 pA, $n = 31$ células, 8 ratas en animales CCI y estresados por frío, respectivamente) con respecto a los animales control (453 ± 27 pA, $n = 66$ células, 19 ratas, $P < 0,01$) lo que reflejaría una mayor expresión de los nAChRs en la membrana de las células cromafines de los grupos CCI y estresados por frío (**Figura 4.11**).

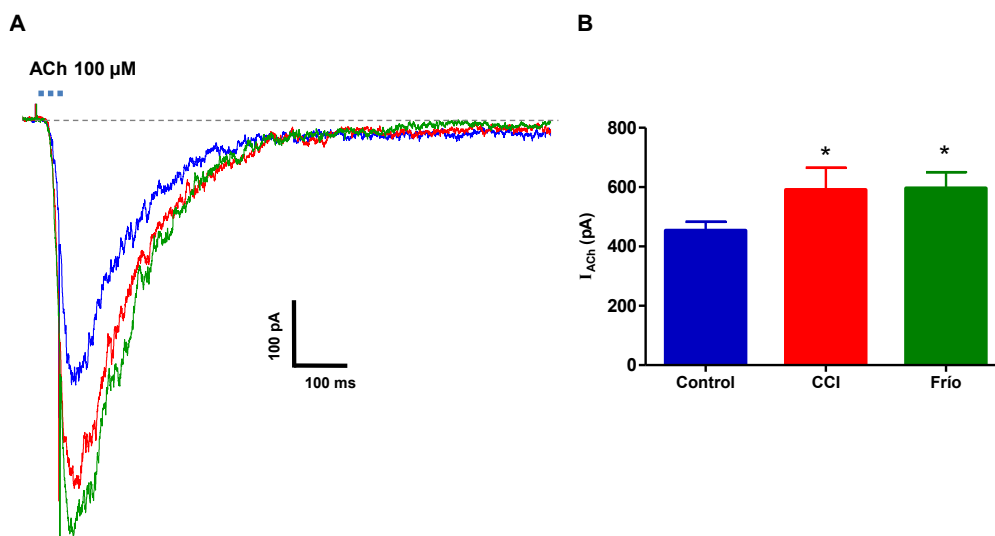


Figura 4.11. Efecto de la CCI y el estrés por frío sobre la magnitud de las corrientes nicotínicas en las células cromafines aisladas de la rata. **A.** Registros representativos de las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) en células cromafines aisladas de animales **Control** ($n = 66$ células, 19 ratas), **CCI** ($n = 31$ células, 8 ratas) y estresados por **Frío** ($n = 44$ células, 15 ratas). **B.** Diagrama de barras de las amplitudes de las corrientes nicotínicas (I_{ACh}) en los tres grupos experimentales mencionados. Los datos se expresan como medias \pm S.E.M. de la amplitud de las corrientes nicotínicas. La significación estadística de las diferencias en la amplitud se evaluó mediante la prueba t de Student para muestras no pareadas con respecto a los animales control. *: $P < 0,05$.

El efecto de la α -RgIA (200 nM, 2 min), una toxina que selectivamente bloquea los nAChRs $\alpha 9^*$ fue también analizado en células de los anteriores grupos experimentales. La administración de α -RgIA produjo una reducción del $17 \pm 3\%$ (desde 435 ± 49 pA hasta 359 ± 51 pA, $P < 0,001$; $n = 20$ células) de la amplitud de las corrientes nicotínicas en las células procedentes de animales control, que aumentó hasta el $45 \pm 4\%$ (desde 509 ± 73 pA hasta 368 ± 37 pA, $P < 0,001$; $n = 4$ células) en las células de los animales CCI y hasta el $34 \pm 7\%$ (desde 650 ± 135 pA hasta 429 ± 90 pA, $P < 0,001$; $n = 7$ células) en las células de los animales estresados por frío (**Figura 4.12**). Estos resultados indican un aumento del número y densidad relativa de los nAChR $\alpha 9$ en las células cromafines de los dos últimos grupos experimentales.

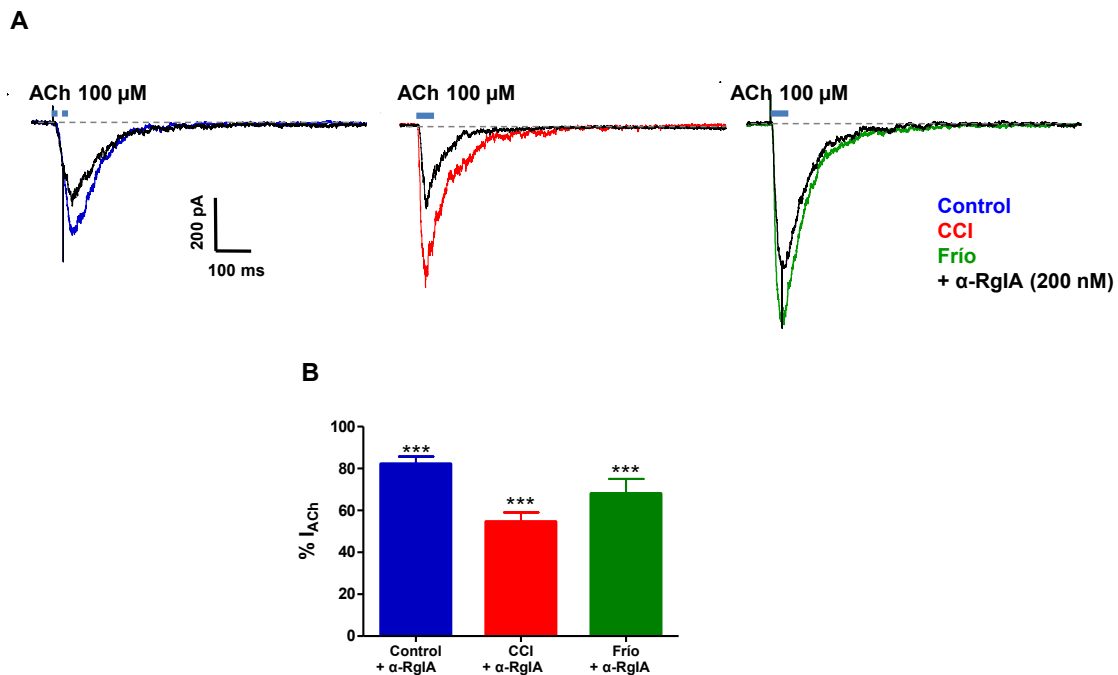


Figura 4.12. Efecto de la α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas en células cromafines aisladas procedentes de animales CCI y sus controles (control y estresados por frío). A. Registros representativos de las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) en células cromafines de animales **Control** (n = 20 células, 6 ratas), **CCI** (n = 4 células, 1 rata) y estresados por **Frío** (n = 7 células, 5 ratas) antes y después de la administración de α -RgIA (+ α -RgIA, 200 nM durante 2 min), V_h = -60 mV. B. Diagrama de barras del efecto de la α -RgIA sobre las corrientes nicotínicas en las células cromafines de los 3 grupos experimentales (**Control**, **CCI** y estrés por **Frío**). Los datos aparecen expresados como porcentajes respecto de la corriente inducida por ACh en ausencia de la toxina en cada condición. La significación estadística se analizó mediante la prueba *t* de Student para una sola muestra. ***: $P < 0,001$.

El acoplamiento excitación-secreción en las células cromafines comienza cuando la ACh, liberada de las terminaciones del nervio esplácnico, se une a los nAChR localizados en la membrana plasmática de las células cromafines. La interacción transmisor-receptor conduce a la apertura del canal catiónico asociado al nAChR y a la generación de un potencial excitador postsináptico (EPSP) que, eventualmente, inducirá la descarga de un potencial de acción. La despolarización asociada al potencial de acción depende de la activación de los canales Na_v y Ca_v mientras que la repolarización se produce por la activación de diferentes clases de canales de potasio (K_v , SK y BK). Es importante señalar que la entrada de Ca^{2+} durante los potenciales de acción es esencial para desencadenar la liberación exocitótica de CAs en este tipo de células.

La aplicación de un pulso despolarizante (+10 mV, 100 ms) en células cromafines en cortes de tejido de glándula adrenal dializadas tanto con una solución rica en K^+ como en otra en la que el ion Cs^+ sustituye al K^+ permitió el registro de las corrientes a través de los canales Na_v , K_v y Ca_v . Como se muestra en la **Figura 4.13**, no se evidenciaron cambios en las corrientes de Na^+ y K^+ en los distintos grupos de animales: control ($1,96 \pm 0,13$ nA y $115,67 \pm 7,79$ pC para la corriente de Na^+ y carga de la corriente de K^+ respectivamente; n = 77 células, 37 ratas), CCI ($2,05 \pm 0,20$ nA y $121,80 \pm 16,06$ pC para la corriente de Na^+ y carga de la corriente de K^+ respectivamente; n = 12

células, 6 ratas) y estrés por frío ($1,74 \pm 0,08$ nA y $97,24 \pm 8,79$ pC para la corriente de Na^+ y carga de la corriente de K^+ respectivamente; $n = 31$ células, 15 ratas). Por el contrario, se observó un aumento de la carga de la corriente de Ca^{2+} en los animales estresados por frío ($36,31 \pm 2,01$ pC, $P < 0,05$; $n = 9$ células, 7 ratas) sin que pudiera constatare cambio alguno en las de los animales CCI ($23,47 \pm 1,77$ pC; $n = 25$ células, 10 ratas) respecto a los animales control ($28,09 \pm 1,52$ pC; $n = 25$ células, 9 ratas).

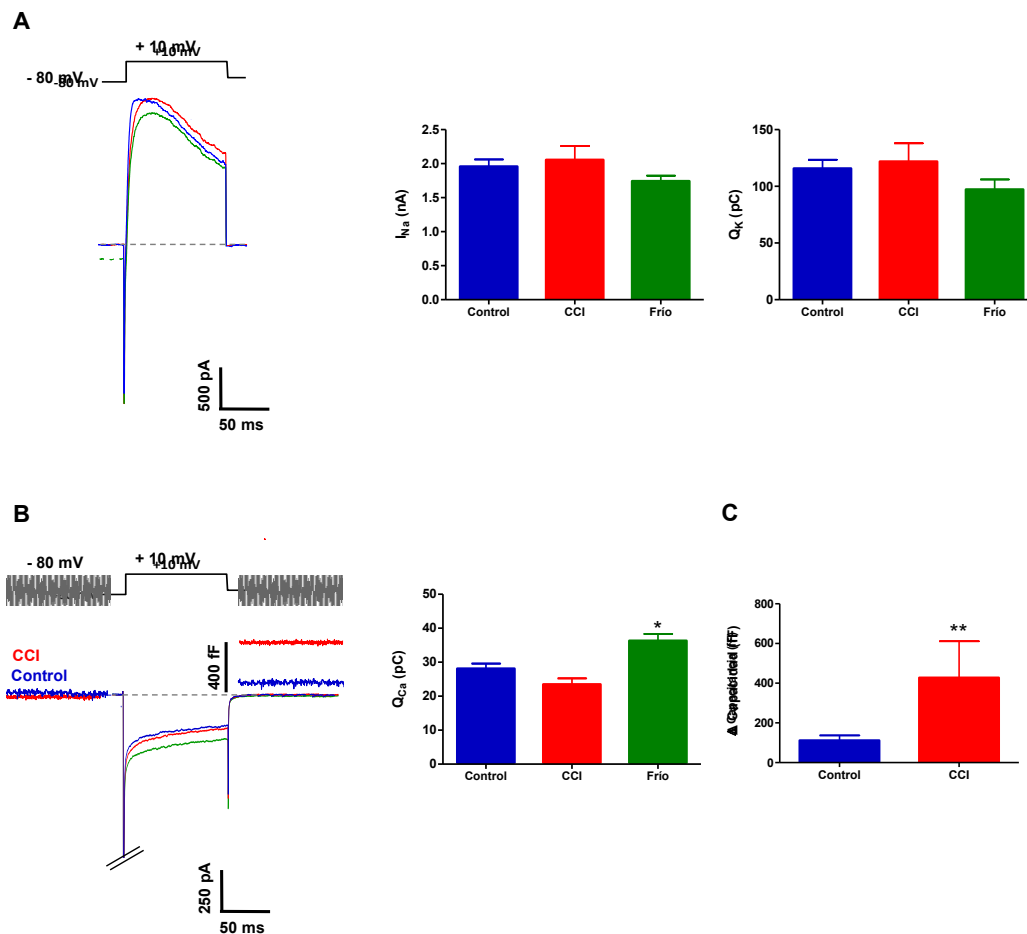


Figura 4.13. Efecto de la CCI del nervio ciático y del estrés por frío sobre las corrientes a través de los canales dependientes de voltaje en células cromafines en cortes de glándula adrenal de la rata. **A.** En el *panel izquierdo* se muestran registros representativos de las corrientes activadas por un pulso despolarizante (+ 10 mV, 100 ms, ver protocolo en la parte superior) en células cromafines dializadas con una solución rica en K^+ procedentes de animales **Control**, **CCI** y estresados por **Frío**. El pulso despolarizante, induce la aparición de una corriente de entrada rápida y transitoria dependiente del flujo de Na^+ seguida de una corriente de salida atribuible a la activación de los canales K_v . En el *panel derecho* se representa diagramas de barras de la amplitud de la corriente de Na^+ (I_{Na}) y de la carga de la corriente de K^+ (Q_{K}) en animales **Control** ($n = 77$ células, 37 ratas), **CCI** ($n = 12$ células, 6 ratas) y estresadas por **Frío** ($n = 31$ células, 15 ratas). **B.** En el *panel izquierdo* se muestran registros representativos de las corrientes activadas por un pulso despolarizante (+10 mV, 100 ms) flanqueado por ondas sinusoidales (± 20 mV; 1 KHz) en células cromafines de rata dializadas con una solución rica en Cs^+ procedentes de animales **Control**, **CCI** y estresados por **Frío** y el incremento de la capacidad celular para animales **Control** y **CCI**. Obsérvese en este caso, que el pulso despolarizante nos permite registrar una corriente de entrada rápida y transitoria dependiente del flujo de Na^+ seguida de una corriente sostenida de entrada atribuible a la activación de los canales Ca_v . En el *panel derecho* se representan diagramas de barras de la carga de la corriente de Ca^{2+} (Q_{Ca}) en animales **Control** ($n = 25$ células, 9 ratas), **CCI** ($n = 25$ células, 10 ratas) y estresadas por **Frío** ($n = 9$ células, 7 ratas) y la diferencia entre la capacidad celular de los animales **Control** ($n = 7$ células) y **CCI** ($n = 4$ células). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M., habiéndose estimado la significación estadística mediante una prueba *t* de Student para muestras no pareadas con respecto a los valores control. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$.

4.3. La contribución de las células cromafines de la médula adrenal en la fisiopatología del dolor inducido por la CCI del nervio ciático

Una vez comprobado que nuestro modelo experimental de dolor neuropático lleva aparejada la activación del sistema simpatoadrenal con importantes similitudes a la que ocurre durante el estrés crónico por frío, nos planteamos investigar cual podría ser la contribución de la médula adrenal a la sintomatología dolorosa de los animales CCI.

Una primera forma de abordar el estudio de esta cuestión fue la de determinar si algunos fármacos con efectos analgésicos bien establecidos eran potencialmente capaces de modular la función secretora de la médula adrenal.

4.3.1. Efecto del SKF29661 sobre la respuesta nocifensiva y la función de la médula adrenal

Los resultados previamente descritos apuntan a las células cromafines como una posible diana de los fármacos analgésicos. Esta hipótesis asume que la secreción de CAs por la médula adrenal interviene en la fisiopatología de nuestro modelo de dolor neuropático, por lo que decidimos comprobarla mediante el empleo de SKF29661, un fármaco inhibidor de la PNMT, la enzima que en la médula adrenal —y en una reducida nómina de otros tejidos— convierte la NA en A.

4.3.1.1. Efecto de SKF29661 sobre la alodinia mecánica y al frío

El efecto de SKF29661 fue evaluado en ambas extremidades (ipsilateral y contralateral a la lesión) de los animales CCI y comparado frente al vehículo (solución salina). La administración de SKF29661 (300 mg/kg cada 24 horas, I.P.; n = 12 ratas) aumentó el umbral de retirada a la estimulación mecánica en la extremidad lesionada en animales intervenidos 7 días antes ($P < 0,001$ respecto al vehículo). Por el contrario, la administración del vehículo no se asoció a efecto significativo alguno sobre la sensibilidad mecánica de la mencionada extremidad (**Figura 4.14A panel superior**). Por otra parte, ni la administración del inhibidor de la PNMT ni del vehículo modificaron la respuesta nocifensiva en la pata contralateral, lo que indicaría que el SKF29661 carece de efecto antinociceptivo a la dosis utilizada (**Figura 4.14B**).

El efecto antialodínico del SKF29661 fue rápido, evidenciándose a los 30 min. de su administración, si bien persistió durante las 24 horas siguientes (**Figura 4.14A, panel inferior**). Así mismo, el efecto no experimentó tolerancia con la administración repetida (300 mg/kg cada 24 horas), desapareciendo 3 días después de finalizar su administración. Ello sugiere que el fármaco carece de efecto modificador de la enfermedad, al menos a la posología empleada.

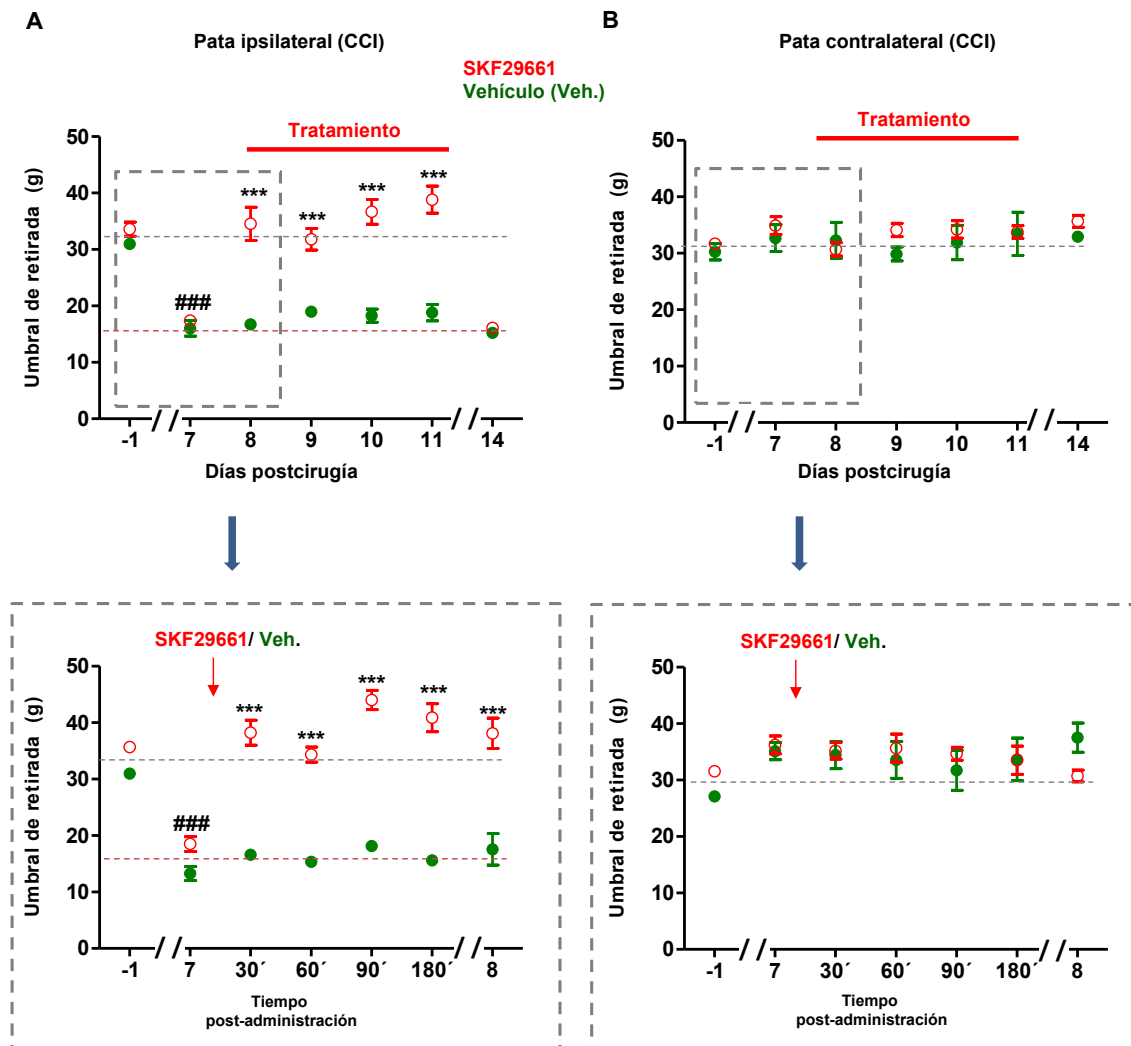


Figura 4.14. Efecto de SKF29661 sobre la alodinia mecánica en animales con lesión por CCI del nervio ciático. A. Efecto de la administración de **SKF29661** (300 mg/kg, cada 24 horas, I.P., $n = 12$ ratas) o de **vehículo** (Veh., solución salina, I.P., $n = 5$ ratas) sobre la sensibilidad mecánica de la extremidad lesionada (derecha). La administración comenzó el día 7 postcirugía y se prolongó durante 4 días consecutivos, valorándose las respuestas nocifensivas cada 24 horas (*panel superior*); en algunos animales la alodinia mecánica se evaluó a los 30, 60, 90, 180 min y 24 h después de la primera dosis (*panel inferior*). B. Efecto de la administración de **SKF29661** (300 mg/kg, cada 24 horas, I.P., $n = 12$ ratas) o de **vehículo** ($n = 5$ ratas) sobre la sensibilidad mecánica de la extremidad contralateral, siguiendo el mismo protocolo temporal que el utilizado en la extremidad lesionada (derecha). Las líneas discontinuas gris y roja indican el umbral de retirada correspondiente a la respuesta basal (-1) y a la registrada 7 días después de la cirugía, respectivamente. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones entre tratamientos en tiempos coincidentes (***: $P < 0,001$). La significación estadística del efecto de la intervención (7 días después de CCI) con respecto a la respuesta basal (-1) se evaluó mediante una prueba *t* de *Student* para muestras pareadas (###: $P < 0,001$).

El efecto de SKF29661 (300 mg/kg, cada 24 h, I.P.; $n = 11$ ratas) sobre la alodinia al frío también fue evaluado en ambas extremidades de los animales CCI (**Figura 4.15**). En la pata ipsilateral a la lesión se observó un efecto antialodínico durante los 4 días de tratamiento, si bien solo fue estadísticamente significativo el día 8 postcirugía ($P < 0,05$ respecto al vehículo); por el contrario, en la pata contralateral a la lesión no se constataron diferencias significativas en las respuestas nocifensivas tras la administración de SKF29661 o del vehículo ($n = 6$ ratas).

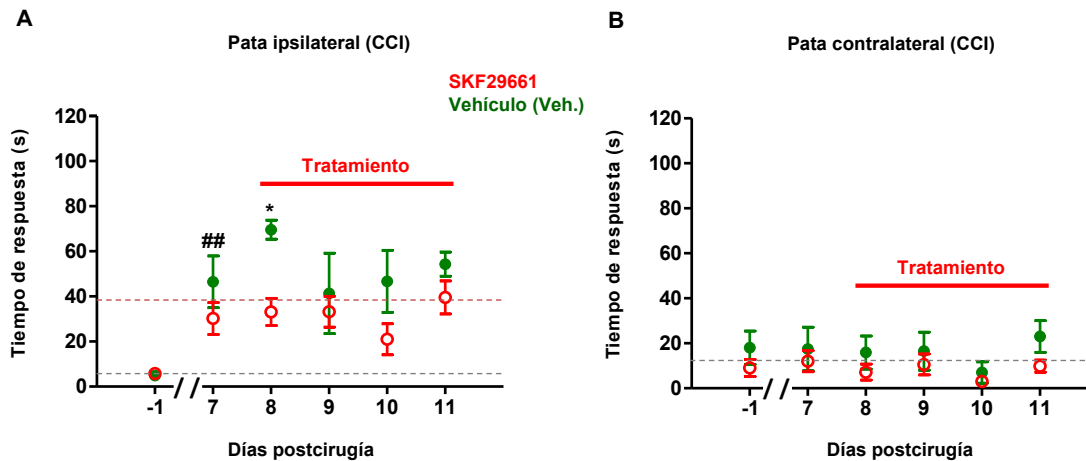


Figura 4.15. Efecto de SKF29661 sobre alodinia al frío en animales con lesión CCI del nervio ciático. **A.** Efecto de la administración de **SKF29661** (300 mg/kg, cada 24 horas, I.P., n = 11 ratas) o de **vehículo** (Veh., solución salina, I.P., n = 6 ratas) sobre la sensibilidad al frío de la extremidad lesionada (derecha). La administración comenzó el día 7 postcirugía y se prolongó durante 4 días consecutivos, valorándose las respuestas nocifensivas cada 24 horas. **B.** Efecto de la administración de **SKF29661** (300 mg/kg, cada 24 horas, I.P., n = 11 ratas) o de **vehículo** (Veh., solución salina, I.P., n = 6 ratas) sobre la sensibilidad térmica de la extremidad contralateral, siguiendo el mismo protocolo que el utilizado en la extremidad lesionada (derecha). Las líneas discontinuas gris y roja indican el tiempo de permanencia correspondiente a la respuesta basal (-1) y a la obtenida 7 días después de la cirugía, respectivamente. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones entre tratamientos en tiempos coincidentes (*: $P < 0,05$). La significación estadística del efecto de la intervención (7 días después de CCI) con respecto a la respuesta basal (-1) se evaluó mediante una prueba *t* de *Student* para muestras pareadas (##: $P < 0,01$).

Tomando en consideración la capacidad de algunos inhibidores de la PNMT para interactuar con los receptores α_2 adrenérgicos (Goldstein *et al.*, 1980) y el bien conocido efecto antinociceptivo y sedante de los agonistas de estos, resolvimos evaluar el efecto del SKF29661 sobre alodinia mecánica en animales previamente tratados con el atipamezol (1 mg/kg, I.P.; n = 8 ratas, **Figura 4.16**). El atipamezol, por sí mismo, no modificó la sensibilidad mecánica de la pata lesionada de los animales CCI ni redujo la elevación del umbral de retirada de la misma producido por SKF29661 (300 mg/kg, I.P.), lo que excluye una contribución de los receptores α_2 al efecto antialodínico del inhibidor de la PNMT.

Aunque el SKF29661 no es capaz de atravesar la BHE (Kuroko *et al.*, 2007) decidimos, no obstante, comprobar que su uso no comportaba alteraciones motoras que pudieran influir en la valoración de las respuestas nocifensivas. En animales control (no operados), el SKF29661 (300 mg/kg, I.P.) no redujo el tiempo de permanencia de los animales en el rodillo del Rota-rod valorado a los 30, 60 y 90 min posteriores a su administración (**Figura 4.17**).

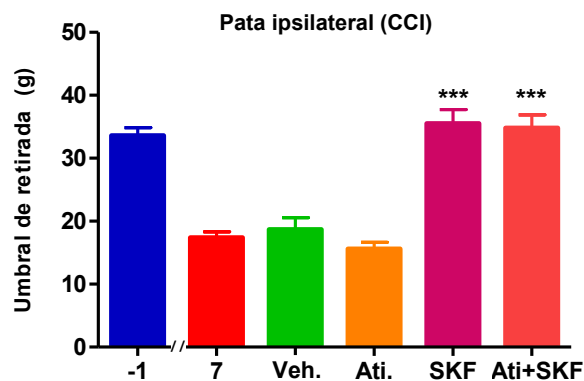


Figura 4.16. Contribución de los receptores α_2 adrenérgicos al efecto antialodínico del SKF29661. Diagrama de barras ilustrativo de los efectos sobre la alodinia mecánica de distintas manipulaciones farmacológicas realizadas en ratas CCI. Los valores basales (-1; $n = 12$ ratas) representan la media de tres determinaciones realizadas la semana anterior a la cirugía. Asimismo se observa el efecto producido por la CCI del nervio ciático (día 7; $n = 12$ ratas), el efecto del vehículo (Veh., solución salina, I.P., $n = 6$ ratas), atipamezol (Ati.; 1 mg/kg, I.P., $n = 6$ ratas), SKF29661 (SKF; 300 mg/kg, I.P., $n = 8$ ratas) y la combinación Ati. + SKF ($n = 8$ ratas). Los experimentos se realizaron los días 7-21 después de la cirugía. La valoración de los efectos de Veh., Ati. y SKF29661 se realizó a los 30 min después de su administración. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. El análisis estadístico se realizó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguido de un test de Newman-Keuls con respecto al vehículo. ***: $P < 0,001$.

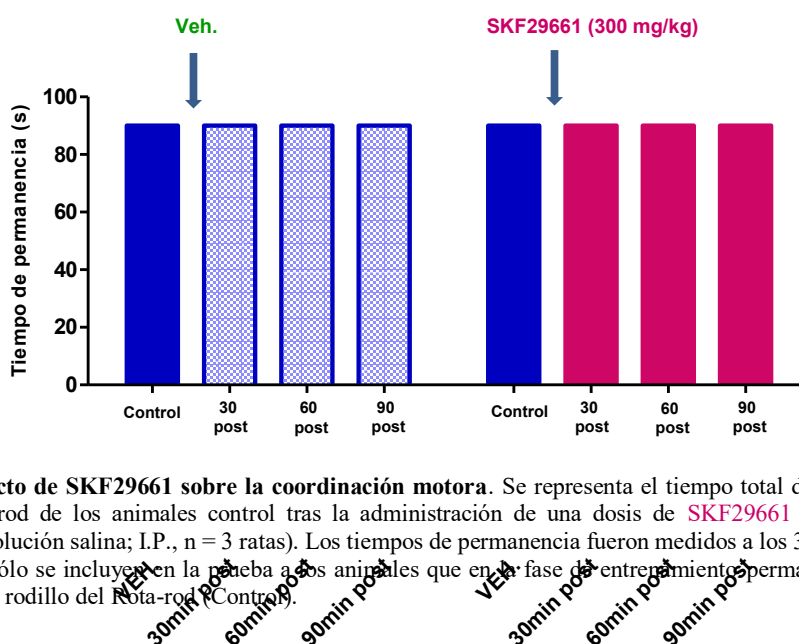


Figura 4.17. Efecto de SKF29661 sobre la coordinación motora. Se representa el tiempo total de permanencia en el rodillo del Rota-rod de los animales control tras la administración de una dosis de SKF29661 (300 mg/kg; I.P.) o vehículo (Veh., solución salina; I.P., $n = 3$ ratas). Los tiempos de permanencia fueron medidos a los 30, 60 y 90 min post-administración. Sólo se incluyen en la prueba a los animales que en la fase de entrenamiento permanecieron un total de 90 segundos en el rodillo del Rota-rod (Control).

4.3.1.2. Efecto del SKF29661 sobre el contenido adrenoglándular y los niveles circulantes de CAs

La administración de una dosis de SKF29661 (300 mg/kg, I.P.) cada 24 h durante 4 días indujo cambios especulares en los contenidos de CAs (A y NA) de las glándulas adrenales de los animales control (no operados) y CCI. Así, en los animales control y en consonancia con el mecanismo de acción de este fármaco (Pendleton *et al.*, 1982; Bao *et al.*, 2007), se observó un descenso del contenido de A desde $10,39 \pm 1,42$ $\mu\text{g/glándula}$ ($n = 12$ ratas) hasta $6,17 \pm 0,84$ $\mu\text{g/glándula}$ ($n = 7$ ratas) acompañado de un incremento del de NA desde $1,84 \pm 0,29$ $\mu\text{g/glándula}$ ($n = 12$ ratas) hasta $4,26 \pm 0,18$ $\mu\text{g/glándula}$ ($n = 7$ ratas), lo que se traduce en una disminución del

ratio A-NA. En las glándulas procedentes de animales CCI se obtuvieron valores de $9,75 \pm 0,44$ $\mu\text{g/g}$ lándula de A y de $1,39 \pm 0,10$ $\mu\text{g/g}$ lándula de NA ($n = 13$ ratas), que tras el tratamiento con SKF29661 pasaron a ser de $12,78 \pm 0,75$ $\mu\text{g/g}$ lándula y de $5,91 \pm 0,26$ $\mu\text{g/g}$ lándula respectivamente para A y NA ($n = 7$ ratas) con la consiguiente disminución del ratio A-NA (**Figura 4.18**).

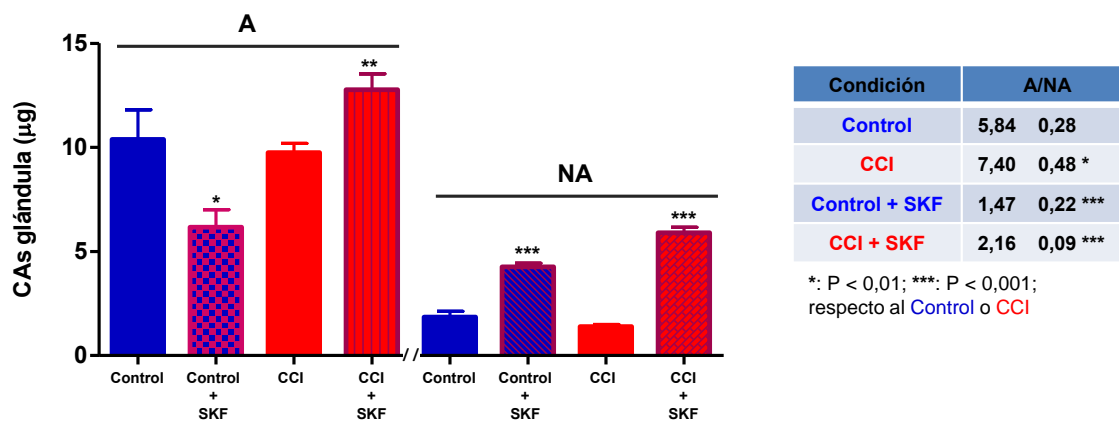


Figura 4.18. Efecto de SKF29661 sobre el contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula adrenal de la rata. Panel izquierdo. Diagramas de barras de los contenidos de A y NA en glándulas adrenales de animales control ($n = 12$ ratas) y CCI del nervio ciático ($n = 13$ ratas). Así mismo, en situación control y CCI fueron tratados con SKF29661 (300 mg/kg, cada 24 horas durante 4 días, I.P., control + SKF, $n = 7$ ratas y CCI + SKF, $n = 7$ ratas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. La significación estadística fue calculada mediante la prueba *t* de Student para muestras no pareadas. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; ***: $P < 0,001$ con respecto a sus controles correspondientes sin tratamiento (Control o CCI). Panel derecho. Tabla en la que se consignan los ratios A-NA (A/NA) para las distintas condiciones experimentales descritas.

Los efectos del SKF29661 sobre el contenido glandular de CAs tuvieron un reflejo en los niveles de CAs circulantes de animales sacrificados por concusión-decapitación. Es de destacar que en los animales CCI no se observó, un incremento significativo de los niveles circulantes de ambas CAs ($7,33 \pm 2,24$ ng/mL de A y $3,53 \pm 0,92$ ng/mL de NA; $n = 6$ ratas) ni modificaciones en el ratio A-NA con respecto a los animales control (no operados; $7,37 \pm 2,51$ ng/mL de A y $4,48 \pm 0,63$ ng/mL de NA; $n = 7$ ratas). El tratamiento con SKF29661, produjo incrementos de la concentración plasmática de NA tanto en animales control ($4,76 \pm 1,42$ ng/mL; $n = 7$ ratas) como CCI ($6,29 \pm 0,77$ ng/mL; $n = 12$ ratas) lo que se asoció a una disminución de la relación A-NA en animales CCI (**Figura 4.19**). Estos resultados son consistentes con la idea de que SKF29661 actúa únicamente cambiando el contenido relativo de las dos catecolaminas adrenales principales (A y NA) en la médula adrenal, sin interferir con el propio mecanismo de liberación. Este efecto fue confirmado mediante experimentos en los que se evaluó el efecto del SKF29661 sobre las principales conductancias iónicas responsables de la exocitosis de CAs en las células cromafines.

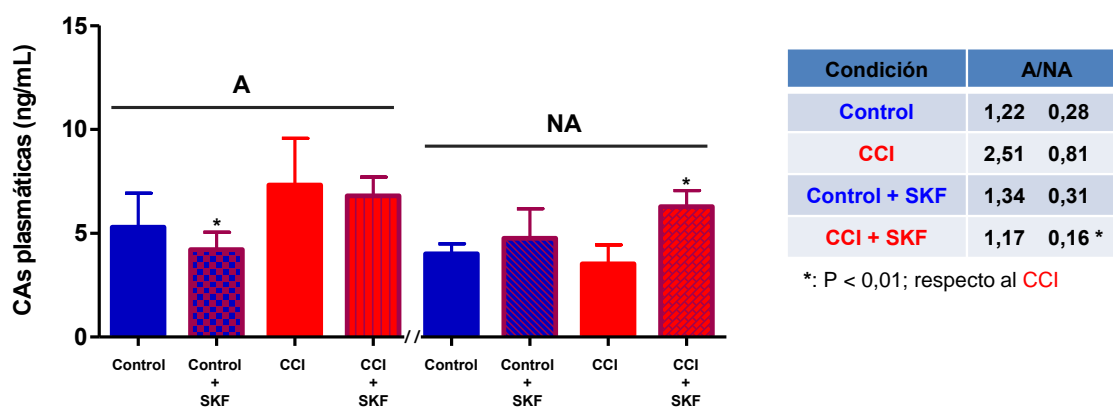


Figura 4.19. Efecto de SKF29661 sobre los niveles plasmáticos de adrenalina (A) y noradrenalina (NA). *Panel izquierdo.* Diagrama de barras de las concentraciones plasmáticas de A (*barras de la izquierda*) y NA (*barras de la derecha*) en animales Control (n = 7 ratas) y CCI (n = 6 ratas) en situación control y tras el tratamiento con SKF29661 (300 mg/kg, cada 24 horas durante 4 días, I.P., Control + SKF, n = 7 ratas, y CCI + SKF, n = 12 ratas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. La significación estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student para muestras no pareadas. *: P < 0,05 con respecto a sus controles correspondientes (Control o CCI). *Panel derecho.* Tabla que muestra la razón A-NA (A/NA) para las distintas condiciones experimentales.

4.3.1.3. Efecto del SKF29661 sobre la función de las células cromafines

A una concentración de 300 μ M, la más alta utilizada en estudios funcionales *in vitro* (Pendleton *et al.*, 1979), el SKF29661 no modificó la amplitud de las corrientes iónicas a través de los canales Na_v , K_v y Ca_v de la membrana de las células cromafines en cortes de tejido de la glándula adrenal tanto de animales control como CCI (datos no mostrados), ni la respuesta exocitótica inducida por la despolarización de la membrana celular (**Figura 4.20**).

Por otra parte, el SKF29661 (300 μ M) no modificó ni la amplitud ni la cinética de las corrientes nicotínicas en células cromafines tanto de ratas control (**Figura 4.21**) como CCI (datos no mostrados).

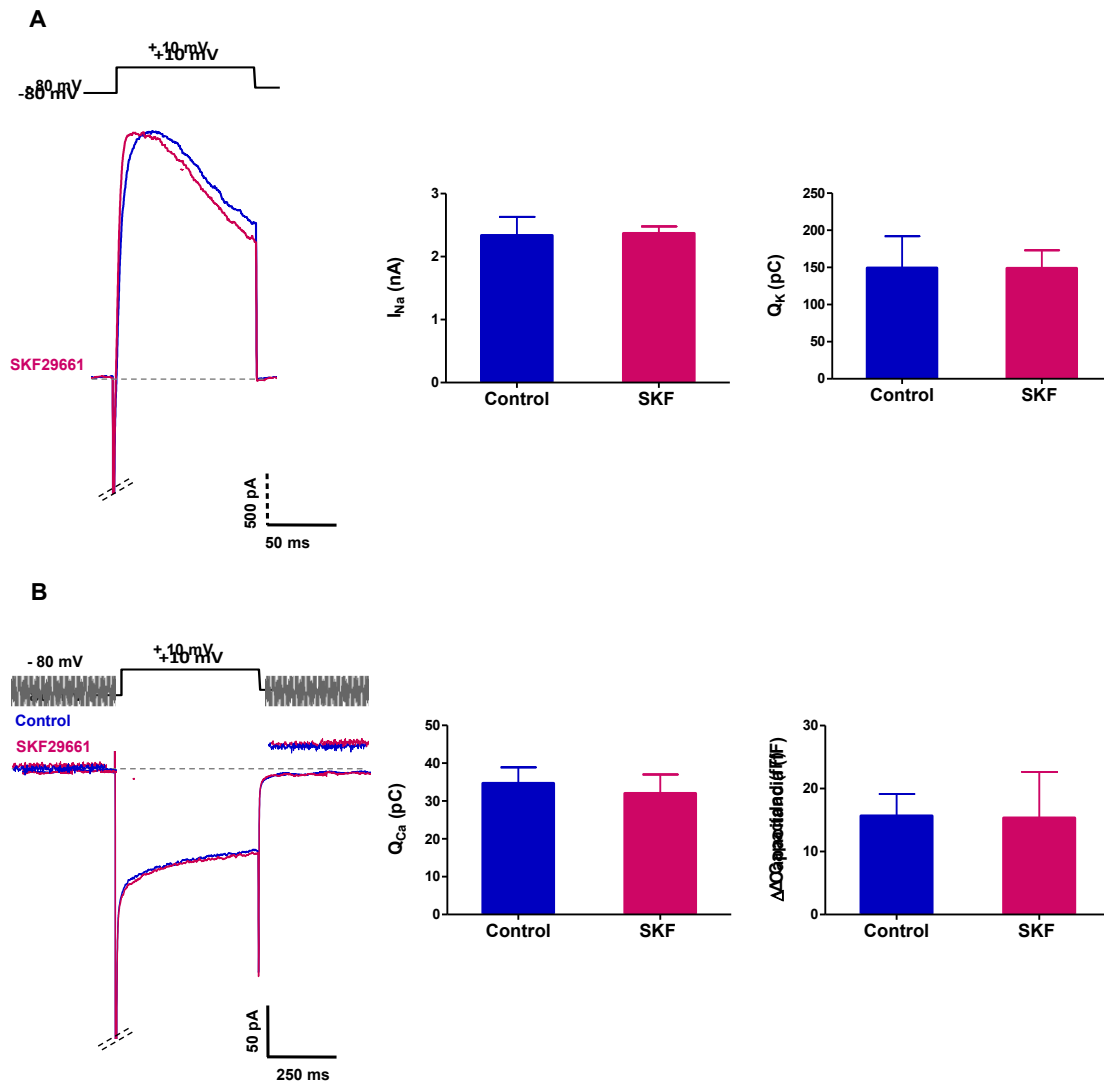


Figura 4.20. Efecto de SKF29661 sobre las corrientes de Na^+ , K^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje y la exocitosis de las células cromafines de rata en cortes de tejido de glándula adrenal. **A. Panel izquierdo.** Registro representativo de corrientes de Na^+ y K^+ activadas por un pulso despolarizante (véase protocolo de voltaje en la parte superior del registro) antes (**Control**) y después (**SKF**) de la administración de SKF29661 (300 μ M, 2 min). **Panel derecho.** Diagramas de barras de la amplitud de la corriente de Na^+ (I_{Na}) y de la carga de la corriente de K^+ (Q_K) antes (**Control**) y después de la administración de SKF29661 (**SKF**, $n = 6$ células, 2 ratas). **B. Panel izquierdo.** Registro representativo de corrientes de Na^+ y Ca^{2+} y de los cambios en la capacidad de la membrana, activadas por un pulso despolarizante (+10 mV, 500 ms) flanqueado por ondas sinusoidales (± 20 mV; 1 KHz) antes (**Control**) y después (**SKF**) de la administración de SKF29661 (300 μ M, 2 min). **Panel derecho.** Diagramas de barras de la carga de la corriente de Ca^{2+} y de los incrementos de capacidad de la membrana inducidos por la despolarización de la membrana ($n = 6$ células, 2 ratas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M., habiéndose estimado la significación estadística mediante una prueba t de Student para muestras pareadas con respecto a los valores control.

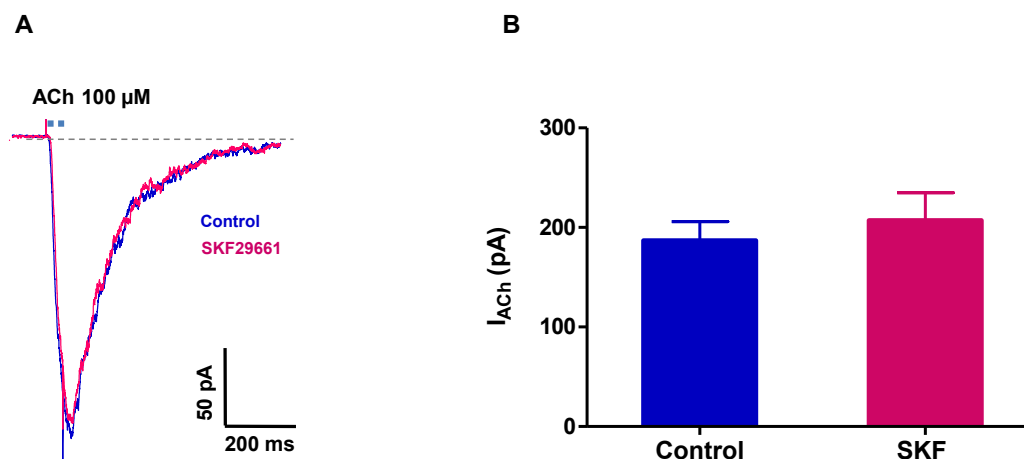


Figura 4.21. Efecto del SKF29661 sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines en cortes de tejido de la glándula adrenal. A. Registros representativos de las corrientes nicotínicas inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) antes (Control) y después (SKF29661) de administrar SKF29661 (300 μ M, 2 min). B. Diagrama de barras ilustrativo del efecto del SKF29661 sobre la amplitud de las corrientes nicotínicas (I_{ACh}). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M., habiéndose estimado la significación estadística mediante una prueba *t* de Student para muestras pareadas con respecto a los valores control.

4.4. Los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos periféricos como dianas de fármacos analgésicos en la CCI del nervio ciático de la rata

En algunas formas de dolor neuropático se ha puesto de manifiesto la participación del SNS, lo que plantea el uso de sustancias con efecto simpaticolítico y, en particular, de agonistas de los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos como fármacos potencialmente útiles en el tratamiento de este tipo de dolor. El estudio experimental de estos compuestos incluyó la evaluación de su posible efecto antialodínico en animales CCI y el análisis de su actuación sobre distintas dianas moleculares implicadas en la función secretora de las células cromafines de la médula adrenal.

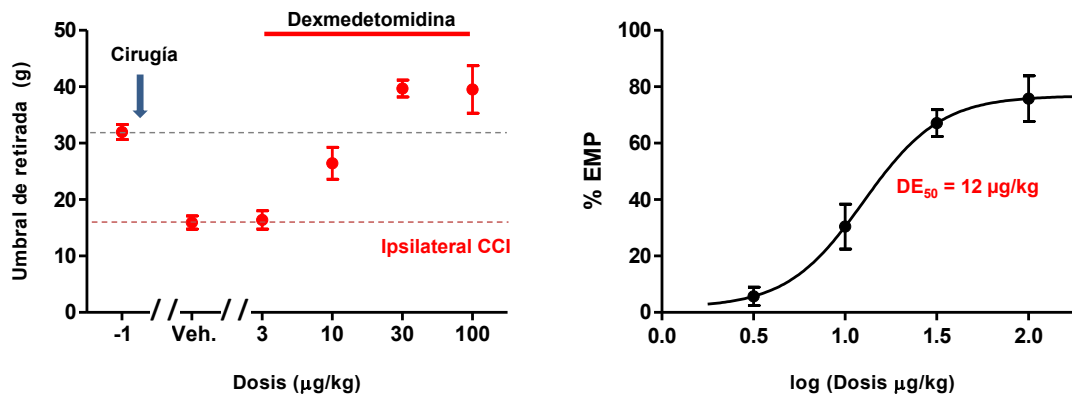
4.4.1. Efectos de la Dexmedetomidina

4.4.1.1. Efecto sobre la alodinia mecánica y al frío

La dexmedetomidina administrada por vía I.P. mostró un efecto antialodínico dependiente de la dosis frente a estímulos mecánicos y térmicos valorados a los 30 min de su administración (Figura 4.22). A dosis de 3 μ g/kg, la dexmedetomidina no produjo un efecto antialodínico significativo ($P > 0,05$), en consonancia con resultados referidos previamente para la dosis de 5 μ g/kg (Guneli *et al.*, 2007). A las dosis de 10 y 30 μ g/kg, la dexmedetomidina indujo un efecto antialodínico circunscrito a la extremidad lesionada. Es de destacar que a dosis superiores (100 μ g/kg), la dexmedetomidina incrementó el umbral de retirada ante los estímulos mecánicos en ambas extremidades (ipsilateral y contralateral a la lesión) que alcanzó valores superiores a los del control (animales no operados; datos no mostrados), lo que resulta indicativo de un efecto antinociceptivo.

Resultados similares se obtuvieron respecto a la alodinia al frío, observándose a la dosis de 100 $\mu\text{g/kg}$ respuestas de duración menor a las observadas incluso antes de la cirugía. Una vez normalizados los resultados obtenidos en función del efecto máximo posible (Park *et al.*, 2012), determinamos que la dosis efectiva 50 (DE_{50}) de la dexmedetomidina fue de 12 $\mu\text{g/kg}$ para la alodinia mecánica y de 10 $\mu\text{g/kg}$ para la alodinia al frío.

A



B

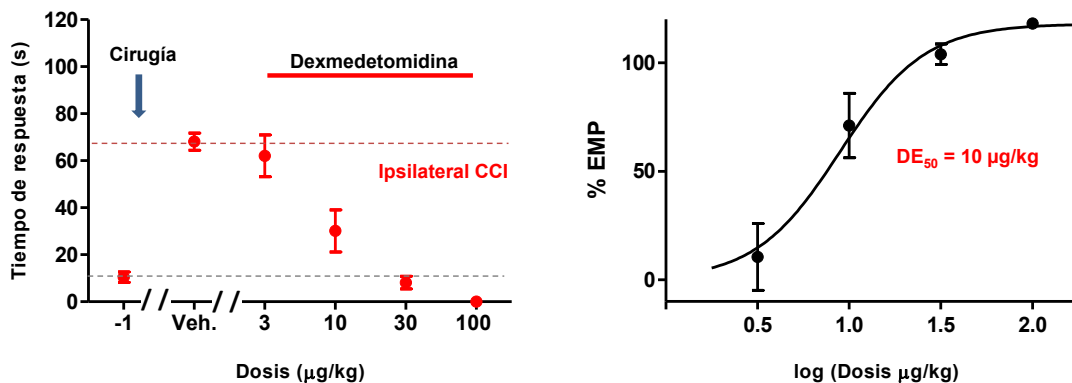


Figura 4.22. Efecto de dexmedetomidina sobre la alodinia mecánica y al frío en ratas con CCI del nervio ciático. A. *Panel izquierdo:* Efecto de la administración por vía I.P. de dosis crecientes de dexmedetomidina sobre la alodinia mecánica en la pata ipsilateral a la CCI del nervio ciático; las líneas discontinuas gris y roja representan respectivamente el umbral de retirada de la pata antes de la cirugía (-1) y, a los 7 días postcirugía tras la administración del vehículo, respectivamente. Vehículo (Veh., suero salino, I.P.). *Panel derecho:* Curva dosis-respuesta antialodínica (mecánica) para la dexmedetomidina ($n = 4-24$ ratas). B. *Panel izquierdo:* Efecto de dosis crecientes de dexmedetomidina (I.P.) sobre la alodinia al frío en la pata ipsilateral a la CCI del nervio ciático; la línea roja discontinua muestra la respuesta observada tras la administración del vehículo (Veh., suero salino, I.P.) 7 días después de la cirugía y la línea gris indica la respuesta obtenida previamente a la intervención (-1). *Panel derecho:* Curva dosis-respuesta antialodínica (frío) para la dexmedetomidina ($n = 8-23$ ratas).

Con el fin de verificar si el efecto antialodínico de la dexmedetomidina está mediado por los receptores α_2 adrenérgicos, recurrimos al atipamezol (1 mg/kg, I.P.), un potente antagonista selectivo de estos receptores utilizado en la clínica veterinaria para revertir los efectos analgésicos-sedantes de los agonistas α_2 . La dosis de atipamezol empleada correspondió a 30 veces la dosis de dexmedetomidina (Pertovaara *et al.*, 2005). Como se muestra en la **Figura 4.23**, la administración

de atipamezol produjo una rápida reversión (< 5 min) del efecto antialodínico (mecánico y al frío) de la dexmedetomidina, careciendo de efecto significativo por sí mismo. Ello confirmaría que los efectos observados con dexmedetomidina están mediados por receptores α_2 adrenérgicos.

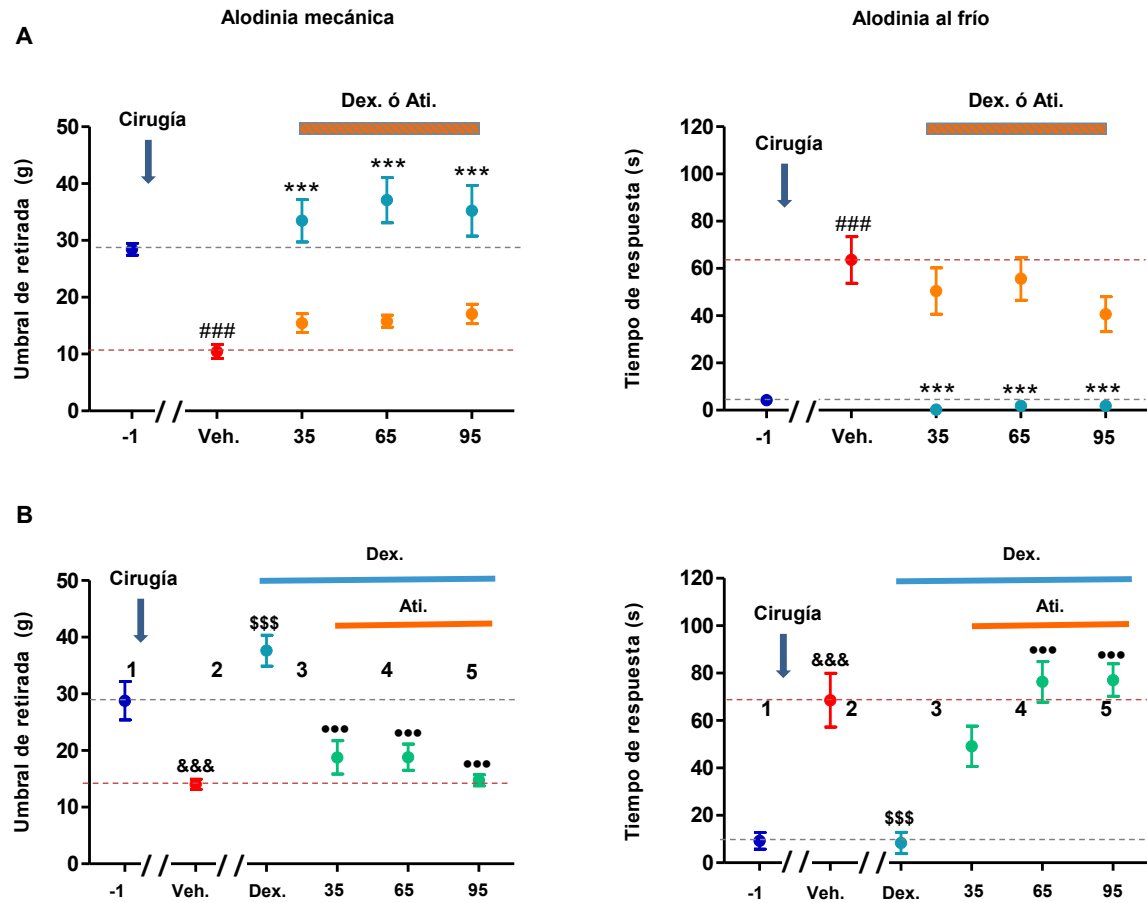


Figura 4.23. Efecto del atipamezol sobre el efecto antialodínico de la dexmedetomidina. A. Curso temporal (35-95 min post-administración) del efecto de la dexmedetomidina (Dex; 30 µg/kg; n = 6 ratas) y de atipamezol (Ati; 1 mg/kg; n = 12 ratas) sobre la alodinia mecánica (panel izquierdo) y al frío (panel derecho), en la pata ipsilateral a la CCI del nervio ciático. Si bien la dexmedetomidina ejerció un rápido efecto antialodínico, el atipamezol no ejerció efecto alguno en los 90 min siguientes a su administración. Se muestra también la respuesta de la extremidad afectada antes (-1; n = 18 ratas) de la cirugía y después de la misma tras la administración del vehículo (Veh., solución salina, I.P.; n = 18 ratas). B. Reversión del efecto antialodínico mecánico (panel izquierdo) y al frío (panel derecho) de dexmedetomidina (Dex; 30 µg/kg, I.P.), por atipamezol (Ati; 1 mg/kg, I.P.; n = 12 ratas). El atipamezol se administró a los 2 min después de la dexmedetomidina, una vez que se comprobó su efecto antialodínico a los 35 min post-administración y se valoró su efecto cada 30 min. Si bien el atipamezol no ejerció efecto por sí mismo, la coadministración con dexmedetomidina mostró una reversión de los efectos antialodínicos. Se muestra también la respuesta de la extremidad afectada antes (-1; n = 16 ratas) de la cirugía y después de la misma tras la administración del vehículo (Veh., solución salina, I.P.; n = 16 ratas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada condición experimental. El análisis estadístico se realizó en A, mediante una prueba de ANOVA de dos vías de medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones durante el tratamiento en tiempos coincidentes (***: $P < 0,001$). La significación estadística del efecto de la cirugía, y después de haber administrado el vehículo, con respecto a la respuesta basal (-1) se evaluó mediante una prueba *t* de Student para muestras pareadas (###: $P < 0,001$). En B, el estudio estadístico de la coadministración de los fármacos se realizó mediante una prueba de ANOVA de una vía seguido del test de Newman-Keuls con respecto a la respuesta basal (-1; &&&: $P < 0,001$), al vehículo (\$\$\$: $P < 0,001$) o respecto a la respuesta antialodínica con dexmedetomidina (•••: $P < 0,001$).

Debe señalarse que si bien las repuestas motoras registradas en los test comportamentales se generan de forma refleja a nivel de la médula espinal, estimamos conveniente descartar que se vieran influidas por un posible efecto sedante, ejercido a nivel central, por la dexmedetomidina.

Para ello, se valoró el efecto del agonista α_2 (3-100 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) sobre la coordinación motora de animales control (no operados; $n = 4$ ratas) mediante el equipo Rota-rod. Los efectos se valoraron durante los 90 min siguientes a la administración a intervalos de 30 min (**Figura 4.24**). No se constató efecto alguno de la dexmedetomidina sobre el tiempo de permanencia de los animales en el Rota-rod en el rango de dosis de 3-30 $\mu\text{g/kg}$; solamente tras la administración de 100 $\mu\text{g/kg}$ de dexmedetomidina se constató una disminución en la coordinación motora de los animales que comenzó a recuperarse a partir de los 90 min post-administración. En resumen, nuestros resultados sugirieron que la dexmedetomidina ejerce un efecto antialodínico selectivo en los animales con CCI del nervio ciático y un efecto antinociceptivo (analgésico) tanto en dichos animales como en animales control (no operados). Además, el hecho de que el efecto antialodínico de la dexmedetomidina se produzca a dosis a las que no induce sedación, posibilitaría el empleo de este fármaco con fines analgésicos en el tratamiento del dolor neuropático (*Hunter et al., 1997*).

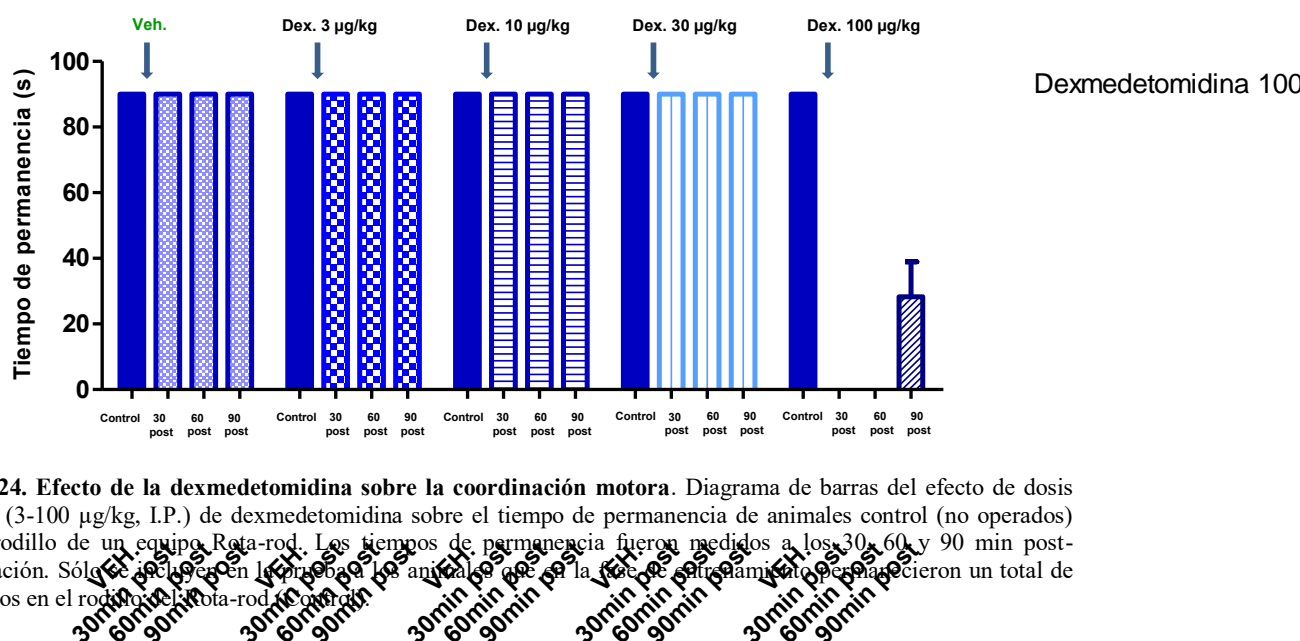


Figura 4.24. Efecto de la dexmedetomidina sobre la coordinación motora. Diagrama de barras del efecto de dosis crecientes (3-100 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) de dexmedetomidina sobre el tiempo de permanencia de animales control (no operados) sobre el rodillo de un equipo Rota-rod. Los tiempos de permanencia fueron medidos a los 30, 60 y 90 min post-administración. Sólo se incluyó en la prueba el animal que en la fase de adaptación de aprendizaje completó un total de 90 segundos en el rodillo de Rota-rod control.

4.4.1.2. Efecto sobre la función de las células cromafines

Una vez comprobado el efecto de la dexmedetomidina sobre las respuestas nocifensivas en nuestro modelo de dolor neuropático, nos propusimos analizar sus efectos sobre distintos parámetros con relevancia en la función de las células cromafines: conductancias iónicas directamente implicadas en el acoplamiento excitación-secreción, transmisión sináptica en la unión nervio espláncnico-célula cromafín y la respuesta exocitótica medida a través de los cambios en la capacidad de la membrana celular.

La dexmedetomidina redujo la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) aplicada localmente sobre la superficie de las células cromafines aisladas de médula adrenal procedentes de animales control (no operados); dicha inhibición se produjo de forma parcialmente reversible y dependiente de la concentración (CI_{50} de 3,62 μ M; $n = 8$ células); es importante señalar que las corrientes nicotínicas de las células cromafines procedentes de animales con CCI del nervio ciático mostraron una sensibilidad a este fármaco similar a la observada en los animales control (CI_{50} de 3,73 μ M, $n = 5$ células; **Figura 4.25**).

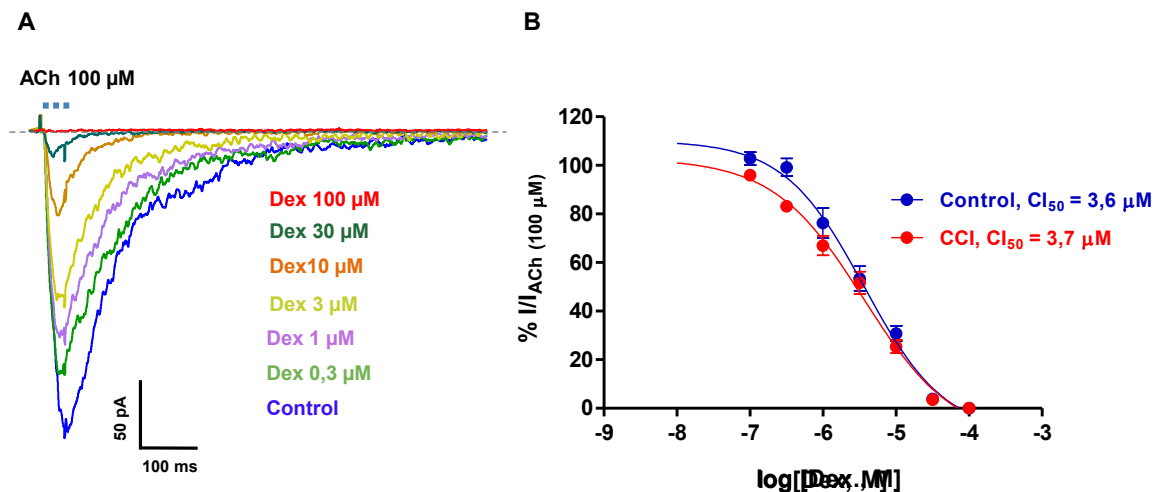


Figura 4.25. Efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de la rata. A. Registros representativos del efecto de diferentes concentraciones (0,3-100 μ M) de dexmedetomidina (Dex.) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) en células cromafines aisladas procedentes de animales control (no operados); $V_h = -60$ mV. **B.** Curva concentración-efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de animales **Control** ($n = 8$) y **CCI** ($n = 5$). Los datos han sido normalizados en cada célula respecto a la corriente inducida por ACh (100 μ M, 50 ms) en ausencia de dexmedetomidina. Los datos aparecen expresados como media \pm S.E.M de las respuestas.

Con el fin de evaluar la participación de receptores α_2 en el efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes nicotínicas, se recurrió nuevamente al atipamezol. Para nuestra sorpresa, este fármaco también redujo la amplitud de las corrientes nicotínicas de las células cromafines ($CI_{50} = 33,66 \mu$ M; **Figura 4.26**) si bien con una potencia 10 veces menor que la de la dexmedetomidina. Este hecho de que tanto los fármacos agonistas como los antagonistas de los receptores α_2 adrenérgicos inhibieran las corrientes a través de los nAChRs a concentraciones 2-3 órdenes de magnitud superiores a su K_D para los receptores α_2 adrenérgicos (Yang *et al.*, 2015), sugería que su efecto bloqueante ganglionar no estaba mediado por esos receptores. Esta interpretación se vio confirmada por el resultado de experimentos en los que se evaluaba el efecto de la administración conjunta de ambos fármacos en células procedentes de animales CCI. Para ello, empleamos una concentración de atipamezol (1 μ M) carente de efectos significativos sobre las corrientes nicotínicas (129 ± 27 pA y 120 ± 26 pA antes y después de la incubación con atipamezol, respectivamente; $n = 3$ células) pero capaces de revertir los efectos de la dexmedetomidina a concentraciones selectivas para los receptores α_2 adrenérgicos (véase más adelante). La

administración de una concentración (5 μM) de dexmedetomidina, próxima a su CI_{50} , sobre las corrientes nicotínicas produjo un bloqueo del $62 \pm 2\%$ de las mismas ($n = 3$ células). Este efecto bloqueante no estaría mediado por receptores α_2 adrenérgicos en virtud de que la incubación previa con atipamezol (1 μM , 2 min) no modificó los resultados obtenidos con dexmedetomidina (**Figura 4.26B y C**).

Por otro lado, la dexmedetomidina, a concentraciones (100 nM) que no afectan a las amplitudes de las corrientes nicotínicas inducidas por ACh (100 μM) exógena, redujo drásticamente y de forma reversible tanto la frecuencia como la amplitud de las sEPSCs registradas en cortes de la glándula adrenal procedentes de animales CCI ($n = 3$ células). Ello sugiere que este fármaco afectaría a la transmisión nerviosa en la unión nervio esplácnico-célula cromafín posiblemente actuando sobre los receptores α_2 adrenérgicos presinápticos inhibidores de la liberación de ACh por las terminaciones del nervio esplácnico (**Figura 4.27**).

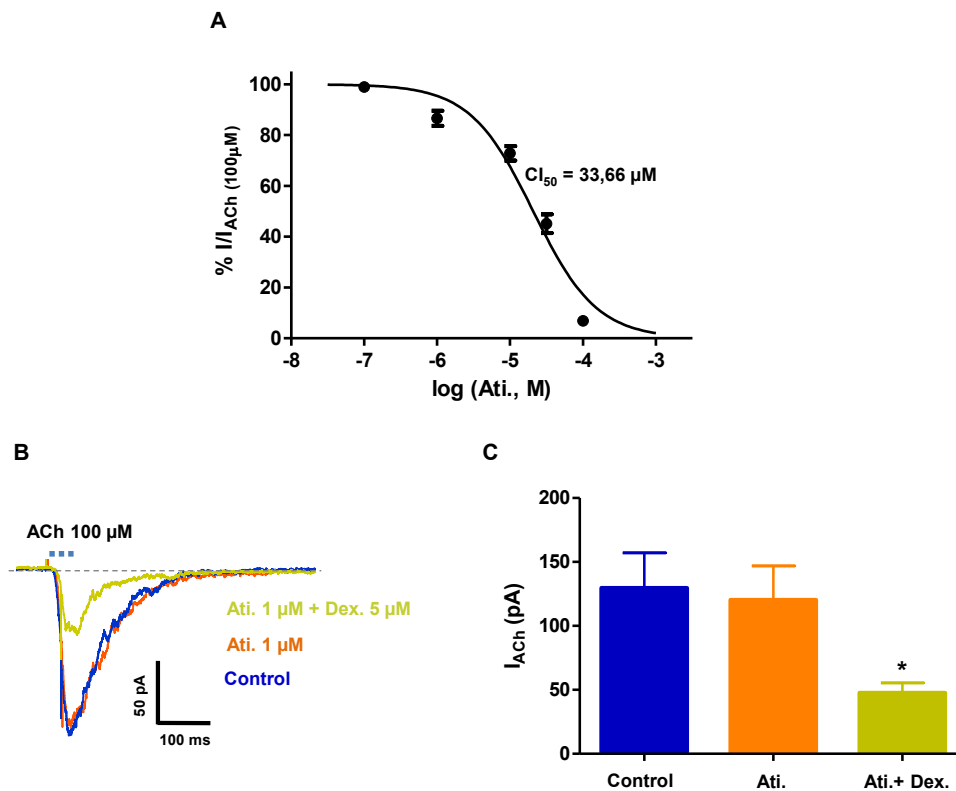


Figura 4.26. Efecto del atipamezol sobre las corrientes nicotínicas de las células cromafines de rata en ausencia y presencia de dexmedetomidina. **A.** Curva concentración-efecto del atipamezol (Ati.) sobre la amplitud de las corrientes inducidas por ACh (100 μM , 50 ms) en células cromafines aisladas de animales control. Los datos han sido normalizados en cada célula respecto a la corriente inducida por ACh (100 μM , 50 ms) obtenida en ausencia de atipamezol y aparecen expresados como media \pm S.E.M ($n = 13$ células). **B.** Registros representativos del efecto de atipamezol (1 μM , 2 min) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μM , 50 ms) en células cromafines de animales CCI antes y después de la administración de dexmedetomidina (Ati. + Dex; 5 μM). La respuesta Control se obtuvo en ausencia de ambos fármacos. $V_h = -60$ mV ($n = 3$ células, 1 rata). **C.** Diagrama de barras de la amplitud de la corriente nicotínica (I_{ACh}) en las condiciones descritas en B. Los valores obtenidos se expresan como medias \pm S.E.M., habiéndose estimado la significación estadística mediante una prueba t de Student para muestras pareadas con respecto a los valores Control. *: $P < 0,05$.

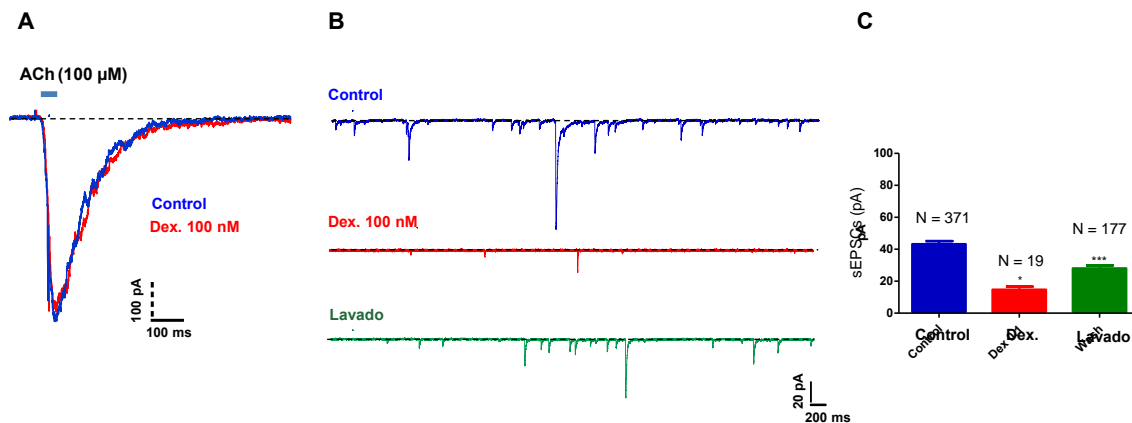


Figura 4.27. Efecto sobre las corrientes excitadoras postsinápticas espontáneas en células cromafines de rata en ausencia y presencia de la dexmedetomidina. **A.** Registros representativos del efecto antes y después de la administración de dexmedetomidina (Dex.; 100 nM, 2 min) sobre las corrientes inducidas por ACh (100 μ M, 50 ms) en células cromafines de animales CCI. La respuesta **Control** se obtuvo en ausencia de dexmedetomidina. $V_h = -60$ mV ($n = 10$ células, 1 rata). **B.** Registro representativo del bloqueo y recuperación de las sEPSCs tras la administración y posterior lavado de la dexmedetomidina (Dex.; 100 nM, 2 min) en células cromafines de animales CCI ($n = 3$ células). $V_h = -60$ mV. **C.** Diagrama de barras de la amplitud de las sEPSCs en las células cromafines. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M., habiéndose estimado la significación estadística respecto al grupo control mediante una prueba *t* de Student para muestras pareadas. *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$.

A continuación, se procedió al estudio del efecto de la dexmedetomidina sobre los principales canales iónicos dependientes de voltaje (Na_v , K_v y Ca_v) de la membrana de las células cromafines. En células aisladas procedentes de animales control, la utilización de una solución intracelular rica en K^+ y la aplicación de un pulso despolarizante (+10 mV, 100 ms) activó conductancias de Na^+ y K^+ responsables, respectivamente, de corrientes iónicas de entrada (deflexiones hacia abajo de la línea de base) rápidamente inactivantes y de corrientes de salida (deflexiones de salida) de carácter sostenido. La corriente de entrada de Na^+ fue inhibida de forma dependiente de la concentración por la dexmedetomidina con una CI_{50} de 50 μ M, que apuntaría a un efecto anestésico local de este compuesto a elevadas concentraciones. La corriente de salida de K^+ también se vio reducida en presencia de dexmedetomidina, si bien dada la variabilidad intercelular de la cinética de esta corriente, la elaboración de una curva dosis-efecto inhibitor del agonista α_2 no resultó posible. A título ilustrativo, basta señalar que a la concentración de 100 μ M, la dexmedetomidina inhibió un $62 \pm 8\%$ la carga de la corriente de K^+ dependiente de voltaje de las células cromafines ($n = 6$ células; **Figura 4.28**).

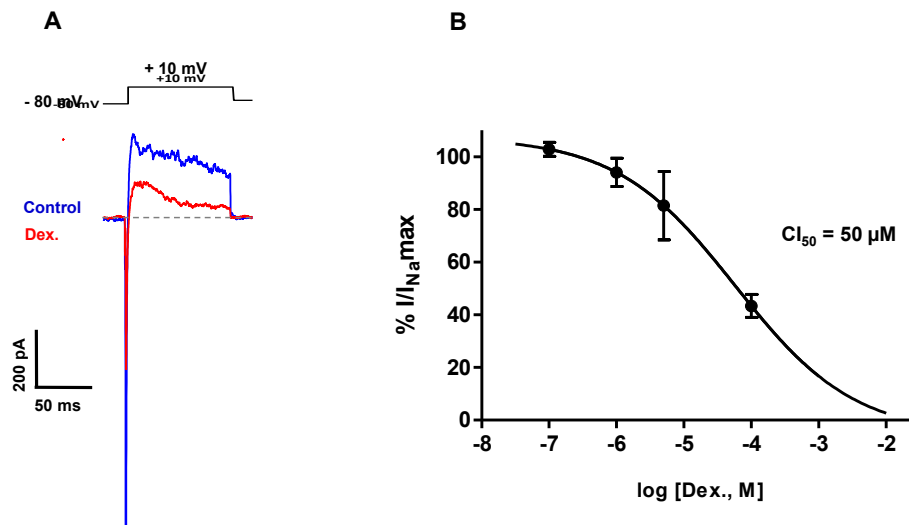


Figura 4.28. Efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes dependientes de voltaje de las células cromafines aisladas de la rata. **A.** Registros representativos del efecto de la dexmedetomidina (**Dex.**; 100 μ M, 2 min) sobre las corrientes de Na^+ (I_{Na}), K^+ (I_{K}) dependientes de voltaje en una célula dializada con una solución rica en K^+ ; se considera **Control** a la respuesta obtenida en ausencia de fármaco. El protocolo de estimulación aparece representado encima de los registros. **B.** Curva concentración-efecto inhibitor de la dexmedetomidina sobre I_{Na} . Cada punto representa la media S.E.M. de la corriente normalizada en cada célula respecto a la condición control ($n = 6$ células).

La despolarización de la membrana de células dializadas con una solución rica en Cs^+ activa corrientes de entrada tanto de carácter rápidamente inactivante (corriente de Na^+) como no inactivante (corriente de Ca^{2+}).

Asumiendo la presencia de receptores α_2 adrenérgicos moduladores de los canales Ca_v en las células cromafines (Kleppisch *et al.*, 1992; Brede *et al.*, 2003; Moura *et al.*, 2006; Lympepropoulos *et al.*, 2007; Knaus *et al.*, 2007), decidimos evaluar el efecto sobre los mismos de una concentración de dexmedetomidina que además de incluir la K_D del fármaco por los receptores α_2 adrenérgicos (≈ 10 nM; McDonald *et al.*, 1997) fuera clínicamente relevantes, considerando como tal la que se aproxima a la máxima que se alcanza en el plasma de una rata cuando se administra una dosis analgésica (30 μ g/kg) de dexmedetomidina (Cornelis *et al.*, 1997; **Figura 4.29A**). Por ello, escogimos la concentración de 100 nM de dexmedetomidina que inhibió un $27 \pm 3\%$ la carga de la corriente a través de los canales Ca_v (desde $28,13 \pm 5,37$ pC hasta $20,78 \pm 3,01$ pC; $n = 8$ células) de las células cromafines procedentes de los animales control. Es de destacar que en las células cromafines procedentes de animales CCI se observó una disminución de la carga de la corriente de Ca^{2+} (desde $20,85 \pm 1,83$ pC hasta $10,43 \pm 1,49$ pC; $n = 5$ células) acompañado por un incremento en el porcentaje de inhibición de la misma ($41 \pm 1\%$) por dexmedetomidina (**Figura 4.29B**). A título comparativo, las células cromafines procedentes de animales estresados por frío presentaron corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de $35,98 \pm 2,54$ pC; $n = 5$ células,

significativamente mayores que las observadas en animales control, si bien mostraron una menor sensibilidad relativa al agonista $\alpha 2$ (inhibición del $19 \pm 2\%$; resultados no mostrados).

Conviene señalar también que el atipamezol ($1 \mu\text{M}$, 2 min) previno el efecto inhibitor de la dexmedetomidina sobre los canales Ca_v tanto en el grupo control como en el CCI, al tiempo que por sí mismo carecía de efecto alguno sobre los mismos (**Figura 4.29C**). Estos resultados implican a los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos en los efectos moduladores de la dexmedetomidina sobre los canales Ca_v y sugieren que en nuestras condiciones experimentales no existe tono adrenérgico endógeno que los module (*Kim et al., 2001; Chen et al., 2009; Maruta et al., 2011*).

Por otra parte, el efecto inhibitor de la dexmedetomidina (100 nM) sobre las corrientes a través de los canales Ca_v (desde $37,50 \pm 2,28 \text{ pC}$ hasta $31,73 \pm 1,36 \text{ pC}$, $n = 4$ células) se tradujo en la disminución de la correspondiente respuesta exocitótica medida a través de los cambios en la capacidad de la membrana celular. Así, el incremento de la capacidad celular inducido por la despolarización de la membrana se redujo un $53 \pm 4\%$ desde $68,75 \pm 18,69 \text{ fF}$ hasta $31,90 \pm 7,64 \text{ fF}$, $n = 4$ células; **Figura 4.30**).

Por último, investigamos el efecto de la dexmedetomidina sobre la respuesta exocitótica inducida por la ACh, el secretagogo fisiológico. Además, y al objeto de que en el protocolo de estimulación participaran junto a los receptores colinérgicos (nAChRs y mAChRs), los principales canales iónicos responsables de los potenciales de acción, la administración de ACh ($100 \mu\text{M}$, 500 ms) se realizó en la modalidad de registro de fijación de corriente. Ello nos permitió registrar la actividad eléctrica de la célula caracterizada por la existencia de despolarización de pequeña amplitud (respuesta nicotínica) sobre la que se superpone uno o unos pocos potenciales de acción. La administración de dexmedetomidina redujo la amplitud de la respuesta nicotínica y abolió el disparo de potenciales de acción. Como consecuencia, el incremento en la capacidad de la membrana registrada en la modalidad de fijación de voltaje, previamente y después de la aplicación de ACh, se vio drásticamente reducido en presencia de dexmedetomidina ($11,88 \pm 7,90 \text{ fF}$; $n = 3$ células) respecto a la situación control ($121,82 \pm 21,81 \text{ fF}$; $n = 8$ células, **Figura 4.31**). En conclusión, la dexmedetomidina sería capaz de inhibir la secreción de CAs por las células cromafines en un rango amplio de concentraciones (100 nM – $100 \mu\text{M}$) implicando mecanismos diversos.

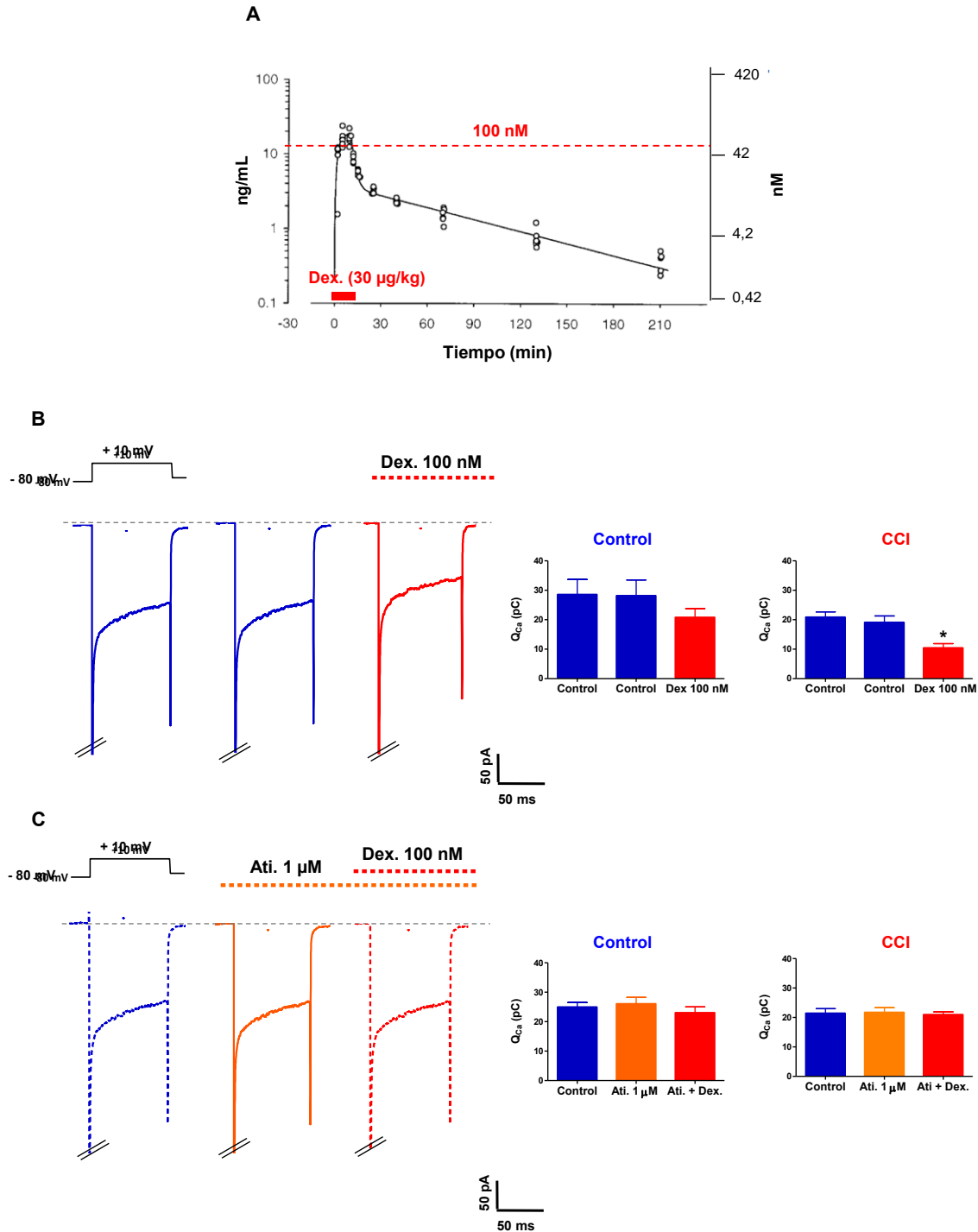


Figura 4.29. Efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje de las células cromafines en cortes de glándula adrenal. **A.** Niveles plasmáticos de dexmedetomidina tras su administración vía I.V. a una rata a la dosis de $30 \mu\text{g/kg}$ (Cornelis *et al.*, 1997). La concentración plasmática en unidades nM (eje de ordenadas derecho) ha sido calculada a partir de los valores expresados en ng/mL (eje de ordenadas izquierdo). **B y C.** *Panel izquierdo.* Registros representativos del efecto de la dexmedetomidina sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) en ausencia (Dex.; 100 nM, *panel superior*) y en presencia de atipamezol (Ati.; 1 μM + Dex; *panel inferior*) en células cromafines procedentes de animales control y CCI. Ambos fármacos fueron administrados mediante perfusión durante un mínimo de 2 min. El protocolo de voltaje aparece representado encima del primer registro. *Panel derecho.* Diagramas de barras de los efectos de la dexmedetomidina sola en células procedentes de animales control ($n = 8$ células, 3 ratas) y CCI ($n = 4$ células, 2 ratas) y en presencia de atipamezol (Control: $n = 5$ células, 2 ratas y CCI: $n = 5$ células, 2 ratas). Los datos son medias \pm S.E.M., habiéndose determinado la significación estadística mediante la prueba de *t* de Student para muestras pareadas con respecto al pulso control inmediatamente antes de la aplicación del fármaco. *: $P < 0,05$.

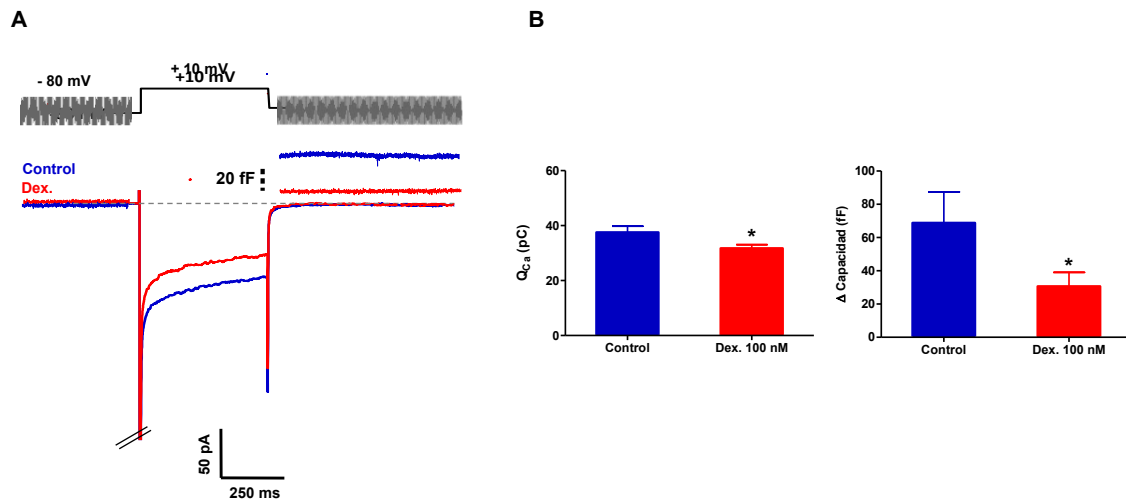


Figura 4.30. Efecto de la dexmedetomidina sobre los incrementos de la capacidad inducidos por la despolarización de la membrana de células cromafines en cortes de la glándula adrenal. A. Registros representativos del efecto de la dexmedetomidina (100 nM, 2 min) sobre el aumento de la capacidad celular. El protocolo de voltaje consistió en un pulso despolarizante (+ 10 mV, 500 ms) flanqueado por ondas sinusoidales (± 20 mV; 1 KHz). Se muestra las corrientes de Na^+ y Ca^{2+} inducidas por la despolarización antes (Control) y durante la administración de dexmedetomidina (Dex.) y los incrementos de la capacidad desencadenados por la entrada de Ca^{2+} . B. Diagrama de barras del efecto de la dexmedetomidina sobre el incremento de la capacidad celular. El incremento (Δ) de capacidad se midió como la diferencia entre la capacidad de la membrana antes y después del pulso despolarizante. Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M obtenidos en 4 células; la significación estadística se determinó mediante la prueba de *t* de Student para muestras pareadas con respecto a la situación control. *: $P < 0,05$.

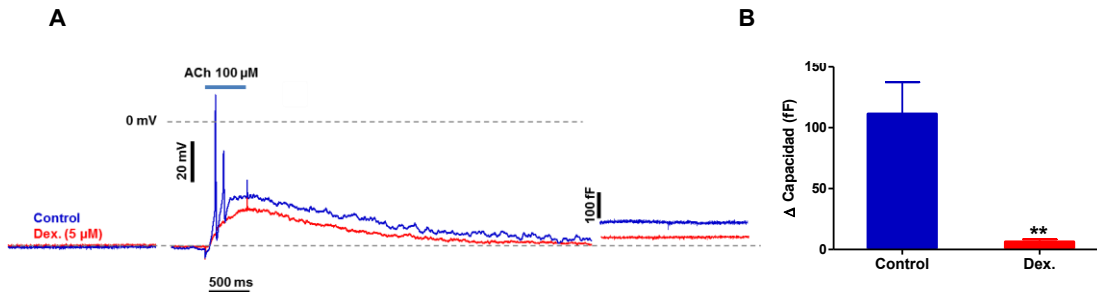


Figura 4.31. Efecto de la dexmedetomidina sobre la respuesta secretora inducida por ACh en células cromafines (corte de tejido) de la glándula adrenal. A. Efecto de la dexmedetomidina (Dex., 5 μ M) sobre la capacidad celular fármaco (Control). El protocolo experimental consistió en el registro de la capacidad celular en la modalidad de *voltage-clamp*, seguido por la aplicación de ACh (100 μ M, 500 ms) en la modalidad de *current-clamp*, finalizando el protocolo con la modalidad de *voltage-clamp* a fin de registrar los posibles cambios en la capacidad inducidos por la ACh. En condiciones control, la ACh induce una onda despolarizante capaz de desencadenar el disparo de potenciales de acción. El incremento de capacidad se mide como la diferencia entre la capacidad de la membrana después y antes de la aplicación de la ACh, ambas mediciones realizadas en la modalidad de *voltage-clamp* ($V_h = -60$ mV). La respuesta Control se registró en ausencia de dexmedetomidina. B. Diagrama de barras ilustrativo del efecto de la dexmedetomidina (5 μ M) sobre los cambios en la capacidad celular inducidos por ACh según se describe en A. La dexmedetomidina es capaz de inhibir de manera significativa el incremento de capacidad (90 %); así mismo se reproducen en esta modalidad de registro otros efectos observados anteriormente como el bloqueo de las corrientes nicotínicas y de las conductancias dependientes de voltaje. Los datos se expresan en valores medios \pm S.E.M obtenidos en 3 células, habiéndose realizado para la significancia estadística la prueba de *t* de Student de muestras pareadas con respecto al valor previo a la aplicación del fármaco. **: $P < 0,01$.

4.4.2. Efectos del MPV2426

Aunque nuestros resultados experimentales sugerían que el efecto antialodínico de la dexmedetomidina se ejerce a nivel periférico, decidimos recurrir al MPV2426, un agonista de los receptores α_2 adrenérgicos que no atraviesa la BHE (Leino *et al.*, 2009) para confirmar la capacidad de los receptores α_2 adrenérgicos periféricos para producir antinocicepción. Las diferencias en la penetrabilidad en el SNC de la dexmedetomidina y del MPV2426 fueron constatadas mediante el registro de sus efectos sobre la presión arterial en ratas anestesiadas con isoflurano (**Figura 4.32**). La administración de dexmedetomidina (100 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) dio lugar a una respuesta bifásica, inicialmente hipertensiva y atribuible a la activación de los receptores α_2 adrenérgicos localizados en el músculo liso vascular, que fue seguida por una disminución de la presión arterial relacionada con la activación de receptores α_2 adrenérgicos centrales (Kenney *et al.*, 2014). Por el contrario, la administración de MPV2426 (300 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) se asoció a un efecto exclusivamente hipertensor que se desarrolló progresivamente (Pertovaara *et al.*, 2004). La administración de atipamezol (1 mg/kg, I.P.) fue capaz de revertir los efectos de los dos agonistas, confirmando la participación de los receptores α_2 adrenérgicos en los mismos.

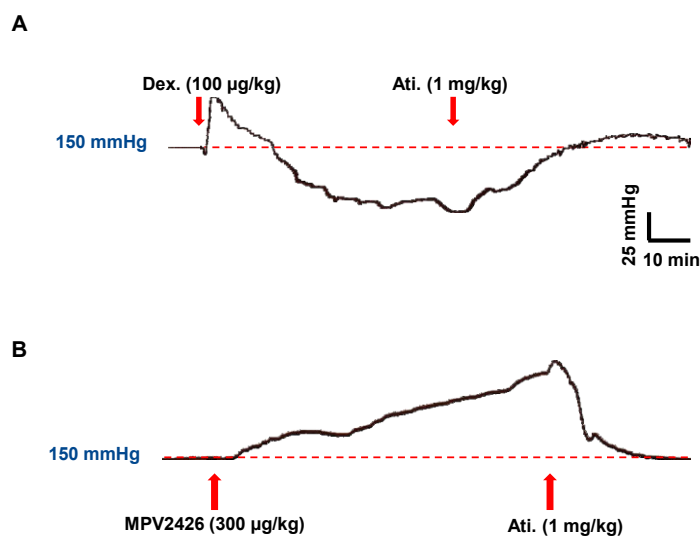


Figura 4.32. Efecto de la dexmedetomidina y del MPV2426 sobre la presión arterial en ratas anestesiadas con isoflurano. **A.** La dexmedetomidina (Dex.; 100 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) produce una elevación inicial de la presión arterial seguida de hipotensión; $n = 2$ ratas. **B.** El MPV2426 (300 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) induce un efecto hipertensor de desarrollo gradual; $n = 2$ ratas. Los efectos de ambos fármacos fueron revertidos por atipamezol (Ati.; 1 mg/kg, I.P.).

4.4.2.1. Efecto sobre la alodinia mecánica y la coordinación motora

Como se ha mostrado previamente, la dexmedetomidina ejerce un efecto sedante a nivel central que se manifiesta, entre otras maneras, por una disminución de la coordinación motora. Por ello, decidimos valorar también el efecto del MPV2426 (300 $\mu\text{g/kg}$, I.P.; $n = 8$ ratas) sobre el tiempo de permanencia en el rodillo de un sistema Rota-rod. Los resultados obtenidos indican que este agonista adrenérgico α_2 , en consonancia con su escasa capacidad para acceder al SNC, no

afecta la coordinación motora (**Figura 4.33**). Debe señalarse que la dosis de MPV2426 utilizada (300 $\mu\text{g/kg}$) es la máxima referida en la literatura que describe los efectos analgésicos del MPV2426, lo que posibilita su empleo en nuestro modelo de dolor neuropático para definir la participación de los receptores α_2 adrenérgicos en el mismo (*Pertovaara et al., 2000; 2004*).

En las ratas CCI la administración sistémica de MPV2426 (300 $\mu\text{g/kg}$, I.P.) revirtió la alodinia mecánica llegándose a registrar valores de los umbrales de retirada similares a los de los animales control o de los animales CCI previamente a la cirugía (**Figura 4.34**).

Al objeto de tratar de identificar el lugar de la acción antialodínica del MPV2426 y en particular de conocer si podría ubicarse sobre las terminaciones nerviosas sensitivas en el lugar de estimulación, se procedió a valorar el efecto de la administración i.pl. (región plantar de la extremidad posterior ipsilateral a la CCI del nervio ciático) del fármaco a dosis de 0,5 y 2 μg . Este fármaco redujo de forma dependiente de la dosis la alodinia mecánica en los animales lesionados (**Figura 4.35**).

Así mismo, el atipamezol (100 ng) abolió el efecto de la coadministración de una dosis submaximal de MPV2426 (0,5 μg), lo que indica que en dicho efecto estarían implicados los receptores α_2 adrenérgicos de la planta de la extremidad afectada. Conviene señalar que a dosis superiores (1 y 2 μg) el atipamezol incrementa el umbral de retirada de la estimulación mecánica, efecto que podría atribuirse a su capacidad para inhibir las corrientes a través de los canales Na_v . Así mismo, la administración local tanto de dexmedetomidina como MPV2426 en la extremidad contralateral a la lesión no produjo efecto antialodínico alguno, lo que confirmaría el carácter local de la administración i.pl.

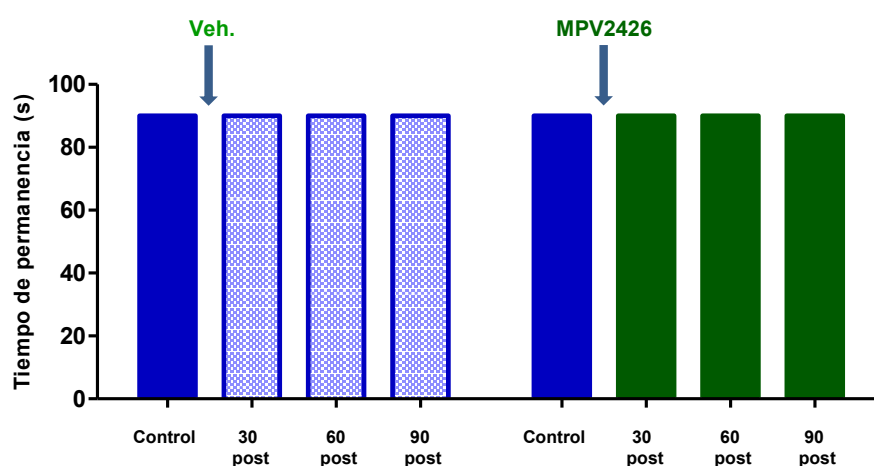


Figura 4.33. Efecto del MPV2426 sobre la coordinación motora. Diagramas de barras del tiempo total de permanencia de ratas control en el Rota-rod valorados a los 30, 60 y 90 min posteriores a la administración de vehículo (Veh., solución salina, I.P.) o MPV2426 (300 $\mu\text{g/kg}$, I.P.). Los datos son expresados como media \pm S.E.M. de los resultados obtenidos en 8 ratas. Sólo se incluyen en la prueba a los animales que en la fase de entrenamiento permanecieron un total de 90 segundos en el rodillo del Rota-rod (Control).

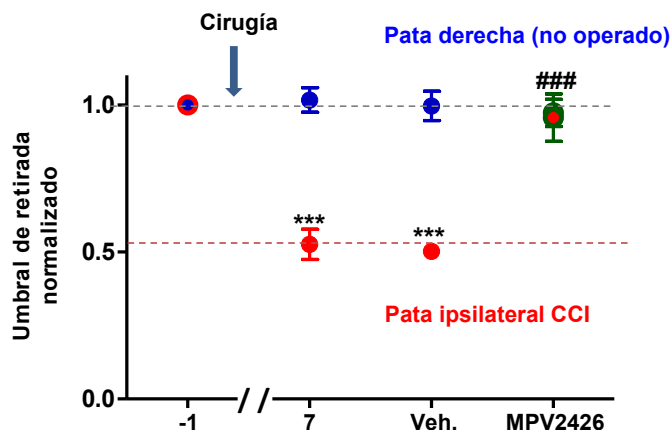


Figura 4.34. Efecto de la administración sistémica de MPV2426 sobre la respuesta nocifensiva al estímulo mecánico. Umbrales de retirada, normalizados en cada rata para la respuesta basal (-1), de animales control (no operados) y CCI. Los valores registrados como día 7 corresponden a las observaciones realizadas en animales control y animales CCI (7 días después de la cirugía) previamente a la administración I.P. de vehículo (Veh., solución salina) o de MPV2426 (300 µg/kg) a ambos grupos de animales. La evaluación de los efectos se realizó entre los días 7 y 21 posteriores a la cirugía (n = 4 ratas y n = 5 ratas para animales control y CCI, respectivamente). Los datos se expresan como valores medios normalizados \pm S.E.M. de cada grupo experimental. La significación estadística del efecto de la intervención se evaluó mediante una prueba *t* de Student para una sola muestra. ***: $P < 0,001$ respecto al control basal (-1); ###: $P < 0,001$ respecto al vehículo.

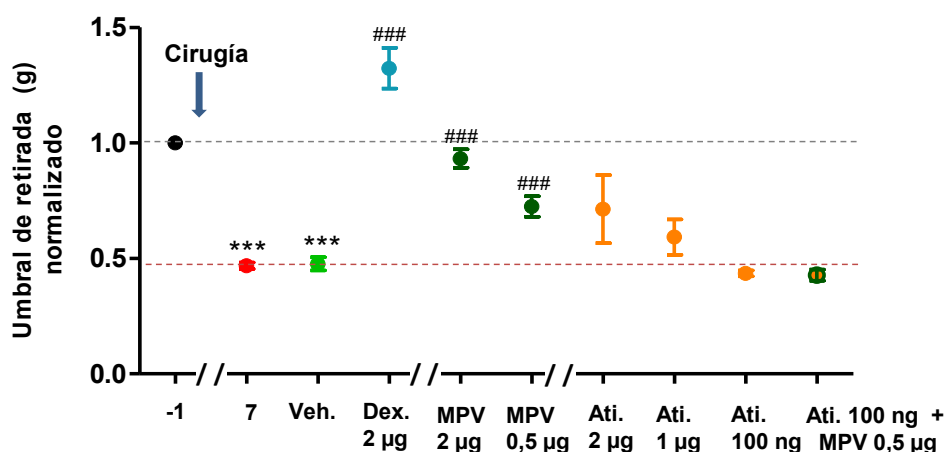


Figura 4.35. Efecto de la administración intraplantar de agonistas α_2 adrenérgicos (Dexmedetomidina y MPV2426) o antagonistas (Atipamezol) sobre la alodinia mecánica en ratas con lesión (CCI) del nervio ciático. Representación de los umbrales de retirada normalizados respecto a las condiciones basales (-1) en animales CCI, antes (7) y tras la administración del vehículo (Veh., solución salina), Dexmedetomidina (Dex.), MPV2426 o atipamezol (Ati.), a las dosis indicadas. La valoración de las respuestas denominadas CCI y tras la administración de los fármacos se realizó entre los días 7 y 21 después de la intervención. Los fármacos fueron administrados i.p. en un volumen total de 20 µL. Experimentos con diferentes concentraciones de MPV2426: n = 9 ratas y experimentos con atipamezol: n = 19 ratas. Los datos se expresan como valores medios normalizados \pm S.E.M. de cada grupo de experimentos. La significación estadística del efecto de la intervención y de la inyección del vehículo se evaluó mediante una prueba *t* de Student para una sola muestra. ***: $P < 0,001$ respecto al control basal (-1); ###: $P < 0,001$ respecto al vehículo.

4.4.2.2. Efecto sobre el contenido adrenoglándular

La administración de una dosis fija de MPV2426 (300 mg/kg, I.P.) en consonancia con el mecanismo de acción de este fármaco (Pertovaara, 2004; Lehtimäki et al., 2008), se observó un incremento en los contenidos de CAs (A y NA) de las glándulas adrenales de los animales control

(no operados) y CCI. Así, en los animales control, se observó un incremento destacado del contenido de A desde $10,39 \pm 1,42 \mu\text{g/glándula}$ ($n = 12$ ratas) hasta $17,70 \pm 0,90 \mu\text{g/glándula}$ ($n = 4$ ratas) acompañado de un incremento del de NA desde $1,84 \pm 0,29 \mu\text{g/glándula}$ ($n = 12$ ratas) hasta $3,02 \pm 0,20 \mu\text{g/glándula}$ ($n = 4$ ratas), sin cambios significativos del ratio A-NA. En las glándulas procedentes de animales CCI se obtuvieron valores de $9,75 \pm 0,44 \mu\text{g/glándula}$ de A y de $1,39 \pm 0,10 \mu\text{g/glándula}$ de NA ($n = 13$ ratas), que tras el tratamiento con MPV2426 pasaron a ser de $13,44 \pm 0,53 \mu\text{g/glándula}$ y de $2,66 \pm 0,17 \mu\text{g/glándula}$ respectivamente para A y NA ($n = 5$ ratas) con la consiguiente disminución del ratio A-NA (**Figura 4.36**).

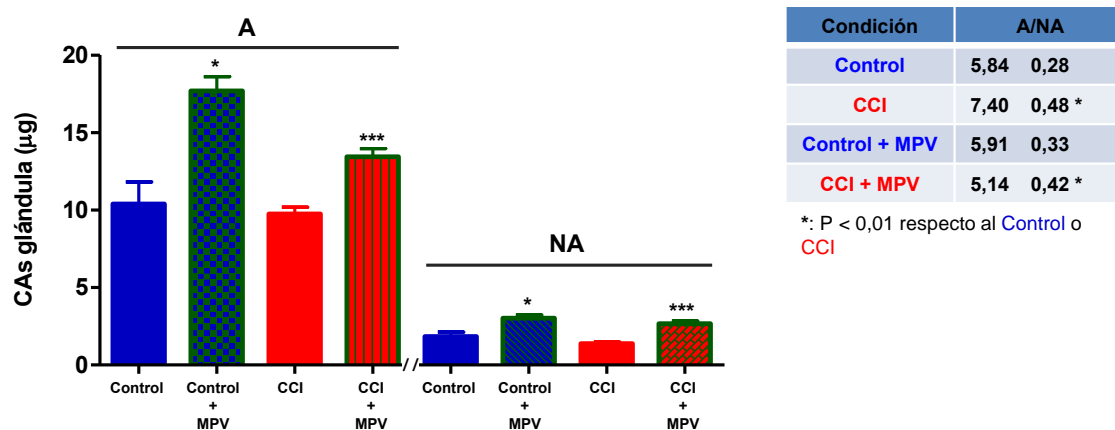


Figura 4.36. Efecto de MPV2426 sobre el contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula adrenal de la rata. *Panel izquierdo.* Diagramas de barras de los contenidos de A y NA en glándulas adrenales de animales control ($n = 12$ ratas) y CCI del nervio ciático ($n = 13$ ratas). Así mismo, los animales fueron tratados con MPV2426 ($300 \mu\text{g/kg}$, una dosis, 30 min antes del sacrificio, I.P) tanto en situación control (Control + MPV; $n = 4$ ratas) y CCI (CCI + MPV, $n = 5$ ratas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. La significación estadística se realizó mediante la prueba *t* de Student para muestras no pareadas. *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$ respecto a sus controles correspondientes sin tratamiento (Control o CCI). *Panel derecho.* Tabla que muestra la razón A-NA (A/NA) para las distintas condiciones experimentales.

4.4.2.3. Efecto sobre la función de las células cromafines

La administración de MPV2426 (100 nM) redujo en un $28 \pm 5\%$ la carga de la corriente a través de los canales Ca_v (desde $24,64 \pm 2,63 \text{ pC}$ hasta $17,63 \pm 3,08 \text{ pC}$; $n = 4$ células) sin modificar la amplitud de la corriente de Na^+ ($1,80 \pm 0,31 \text{ nA}$ y $1,74 \pm 0,32 \text{ nA}$ en ausencia y presencia de MPV2426, respectivamente) de las células cromafines procedentes de animales control. Este efecto fue prevenido por atipamezol ($1 \mu\text{M}$), en consonancia con la participación de receptores α_2 adrenérgicos en el mismo. En células provenientes de animales CCI la despolarización ($+10 \text{ mV}$, 500 ms) de la membrana activó corrientes de Ca^{2+} (desde $60,86 \pm 2,29 \text{ pC}$ hasta $40,74 \pm 1,24 \text{ pC}$; $n = 4$ células) e incrementos en la capacidad de las células cromafines, que se vieron reducidos significativamente ($71 \pm 10\%$; $n = 3$) en presencia de MPV2426 (100 nM , 2 min ; **Figura 4.37**).

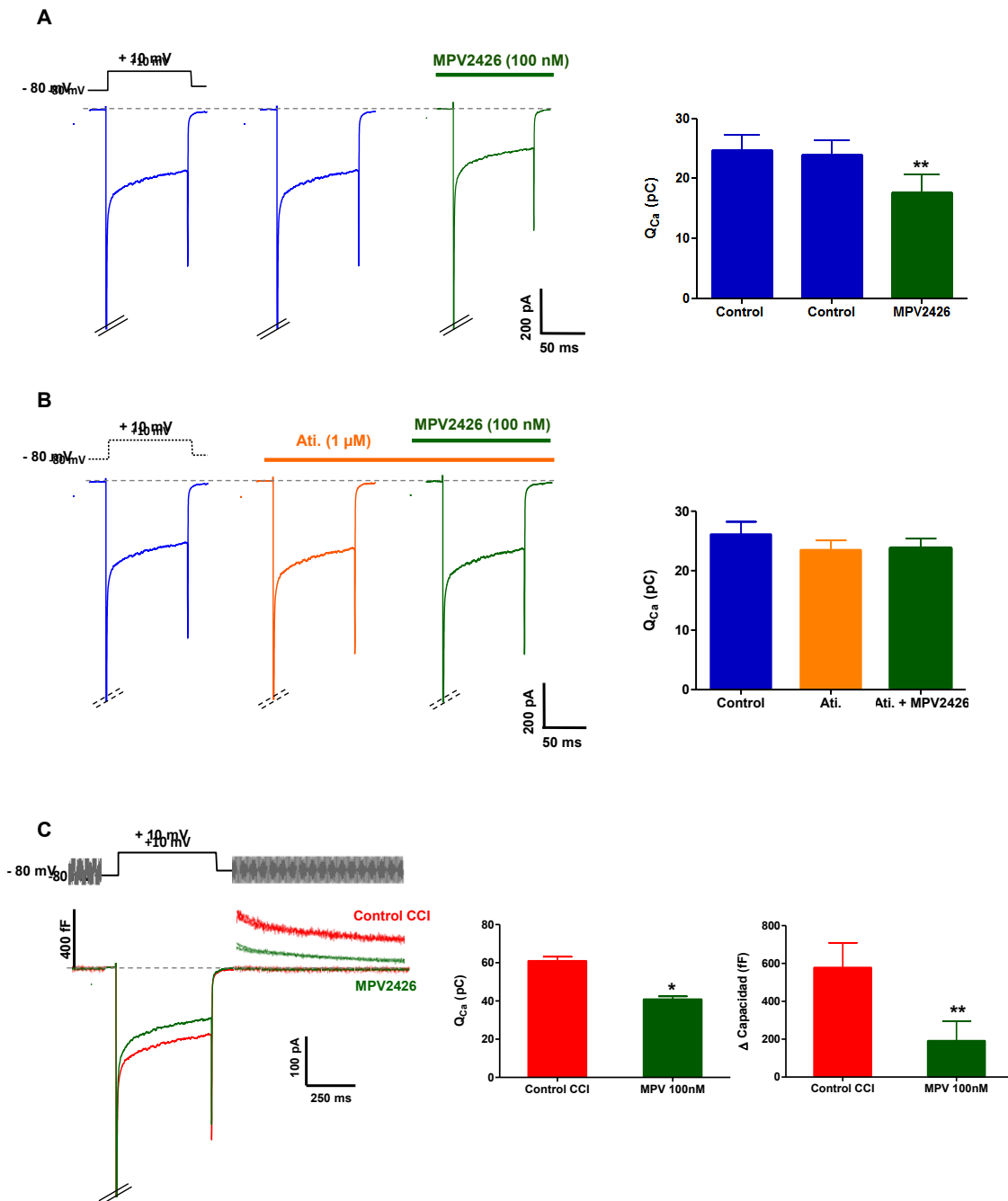


Figura 4.37. Efecto del MPV2426 sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje y la capacidad de la membrana de las células cromafines en cortes de glándula adrenal. A y B. Paneles izquierdos. Registro representativo del efecto del MPV2426 sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) en ausencia (MPV2426; 100 nM, *panel superior*) y en presencia de atipamezol (Ati.; 1 μM + MPV2426, *panel inferior*) de células cromafines procedentes de animales control. Ambos fármacos fueron administrados mediante perfusión durante un mínimo de 2 min. El protocolo de voltaje aparece representado encima del primer registro. *Paneles derechos.* Diagramas de barras de los efectos del MPV2426 solo en células procedentes de animales control (n = 4 células, 2 ratas) y en presencia de atipamezol (n = 5 células, 2 ratas). **C. Panel izquierdo.** Registros representativos del efecto del MPV2426 sobre las corrientes de Ca^{2+} dependientes de voltaje (Ca_v) y sobre el aumento de la capacidad celular en células cromafines procedentes de animales con CCI. El protocolo de voltaje consistió en un pulso despolarizante (+ 10 mV, 500 ms) flanqueado por ondas sinusoidales (± 20 mV; 1 KHz). *Panel derecho.* Diagrama de barras del efecto del MPV2426 sobre la carga de corriente de Ca^{2+} y el incremento de la capacidad celular. El incremento (Δ) de capacidad se midió como la diferencia entre la capacidad de la membrana antes y después del pulso despolarizante. Los datos se representan como medias \pm S.E.M., habiéndose determinado la significación estadística mediante la prueba de *t* de Student para muestras pareadas con respecto al control obtenido inmediatamente antes de la aplicación del(los) fármaco(s). **: $P < 0,01$.

4.4.2.4. Efectos sobre la función de las neuronas DRG

Si bien los resultados obtenidos tanto *in vitro* como *in vivo* con el inhibidor de la PNMT sugieren que los fármacos modificadores de la liberación de CAs por las células cromafines de la medula adrenal podrían ser útiles en el tratamiento de algunas formas de dolor neuropático experimental, las dianas de dichos fármacos, entre lo que cabe incluir a los agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos de acción periférica, pueden ubicarse también fuera de la médula adrenal y contribuir tanto al efecto terapéutico como a los posibles efectos adversos. Una de dichas localizaciones se hallarían en las neuronas nociceptivas primarias (DRG), que al igual que las células cromafines adrenomedulares experimentan cambios en los cuadros de dolor crónico. Entendemos, por ello, que muy probablemente los nuevos analgésicos (tanto nuevos compuestos como antiguos fármacos para los que el dolor puede constituir una nueva indicación) actúen de forma dependiente de contexto, es decir, su efecto analgésico se produciría en virtud de los cambios fisiopatológicos que acontecen en situaciones de dolor crónico.

Como se mencionó en la Introducción, los receptores α_2 adrenérgicos se localizan en las neuronas simpáticas posganglionares así como en las neuronas DRG. En las primeras inhiben eficazmente la liberación de NA que actúa sobre receptores localizados en las células efectoras del SNS así como en las células que participan en la respuesta inflamatoria como los macrófagos y las propias neuronas DRG. Los receptores α_2 adrenérgicos se localizarían tanto en las terminaciones nerviosas centrales y periféricas de estas neuronas como en los somas de las mismas. En consecuencia, los agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos pueden actuar periféricamente a distintos niveles, produciendo efectos complejos.

Las amplitudes de las corrientes de Na^+ dependientes de voltaje del soma de neuronas DRG (ganglios L5 y L6) no mostraron diferencias entre los animales control ($6,43 \pm 1,69$ nA; $n = 14$ células, 8 ratas) y CCI ($6,72 \pm 0,77$ nA; $n = 6$ células, 3 ratas). Por el contrario, las corrientes a través de los canales de Ca_v , evaluadas mediante la carga de las mismas, en animales CCI ($215,02 \pm 14,03$ pC; $n = 7$ células, 1 ratas) fueron menores que en los animales control ($430,10 \pm 87,28$ pC, $n = 10$ células, 2 ratas). Así mismo, el MPV2426 ($1 \mu\text{M}$) fue capaz de producir un bloqueo significativo de la carga de la corriente de Ca^{2+} tanto en animales control ($10 \pm 3\%$; $n = 10$ células, 2 ratas) como CCI ($19 \pm 6\%$; $n = 7$ células, 1 rata) y de la amplitud de la corriente de Na^+ ($21 \pm 0,9\%$) en las neuronas procedentes de animales CCI (**Figura 4.38**).

Por otra parte, y mediante el empleo de la modalidad de fijación de corriente de la técnica de *patch-clamp*, se evidenció una mayor excitabilidad medida como frecuencia de disparo de potenciales de acción, en respuesta a la inyección de un pulso de corriente, en las neuronas DRG procedentes de animales CCI ($n = 3$ células, 1 rata), que las neuronas de animales control ($n = 4$ células, 2 ratas). Adicionalmente, el MPV2426 ($10 \mu\text{M}$) redujo el potencial umbral de disparo de

potenciales de acción e incrementó la frecuencia de los mismos durante el pulso de corriente (**Figura 4.39A y B**). Este hecho se relaciona con una disminución progresiva de la AHP observada en neuronas de animales CCI y de la amplitud de los potenciales de acción, indicativos de la inactivación acumulativa de los canales Na_v y Ca_v durante el tren de potenciales (**Figura 4.39C**). En conjunto, estos resultados serían consistentes con un efecto pronociceptivo del MPV2426 como consecuencia del incremento de la excitabilidad que produce en las neuronas de los animales CCI. Este hallazgo contrasta con el efecto antialodínico obtenido en los estudios comportamentales y sugeriría que los receptores α_2 adrenérgicos responsables del mismo podrían localizarse en estructuras distintas a las neuronas DRG y, más concretamente, en las terminaciones nerviosas de las neuronas simpáticas posganglionares. El hecho de que en los ganglios espinales de los animales CCI se constata la infiltración de fibras catecolaminérgicas junto con la mayor expresión de receptores α_2 adrenérgicos sugerida por los experimentos realizados con MPV2426, apuntaría a una participación también del sistema nervioso simpátoneural en la fisiopatología de nuestro modelo de dolor neuropático.

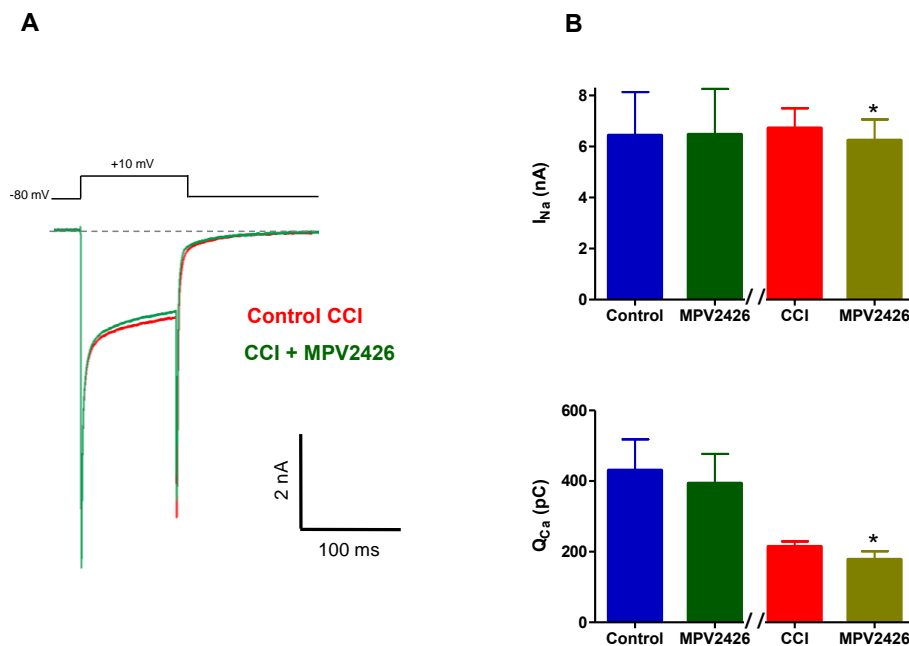


Figura 4.38. Efecto del MPV2426 sobre las conductancias de Na^+ y Ca^{2+} dependientes de voltaje en neuronas de los ganglios espinales (DRG) L5 y L6 de animales con lesión (CCI) del nervio ciático y sus controles. **A.** Registro representativo de corrientes de Na^+ y Ca^{2+} obtenidos en una célula, procedente de un animal CCI, dializada con una solución rica en Cs^+ en las que la aplicación de un pulso despolarizante (ver protocolo en parte superior del registro) origina una corriente de entrada rápida y transitoria dependiente del flujo de Na^+ seguida de una corriente sostenida de entrada atribuible a la activación de los canales Ca_v . La incubación de la misma con MPV2426 (1 μM , 2 min) indujo un bloqueo de ambas conductancias activadas por la despolarización de la membrana. **B.** Diagramas de barras ilustrativos de los efectos de MPV2426 (1 μM , 2 min), *Panel superior*. Las amplitudes de las corrientes dependientes de voltaje de Na^+ registradas en células de animales Control (n = 14 células, 8 ratas) y CCI (n = 10 células, 2 ratas) y *Panel inferior*. La carga de la corriente de Ca^{2+} en neuronas obtenidas de animales Control (n = 6 células, 3 ratas) y CCI (n = 7 células, 1 rata). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. de las corrientes, habiéndose estimado la significación estadística mediante la prueba t de Student para datos pareados respecto a los valores previos a la administración del fármaco *: P < 0,05.

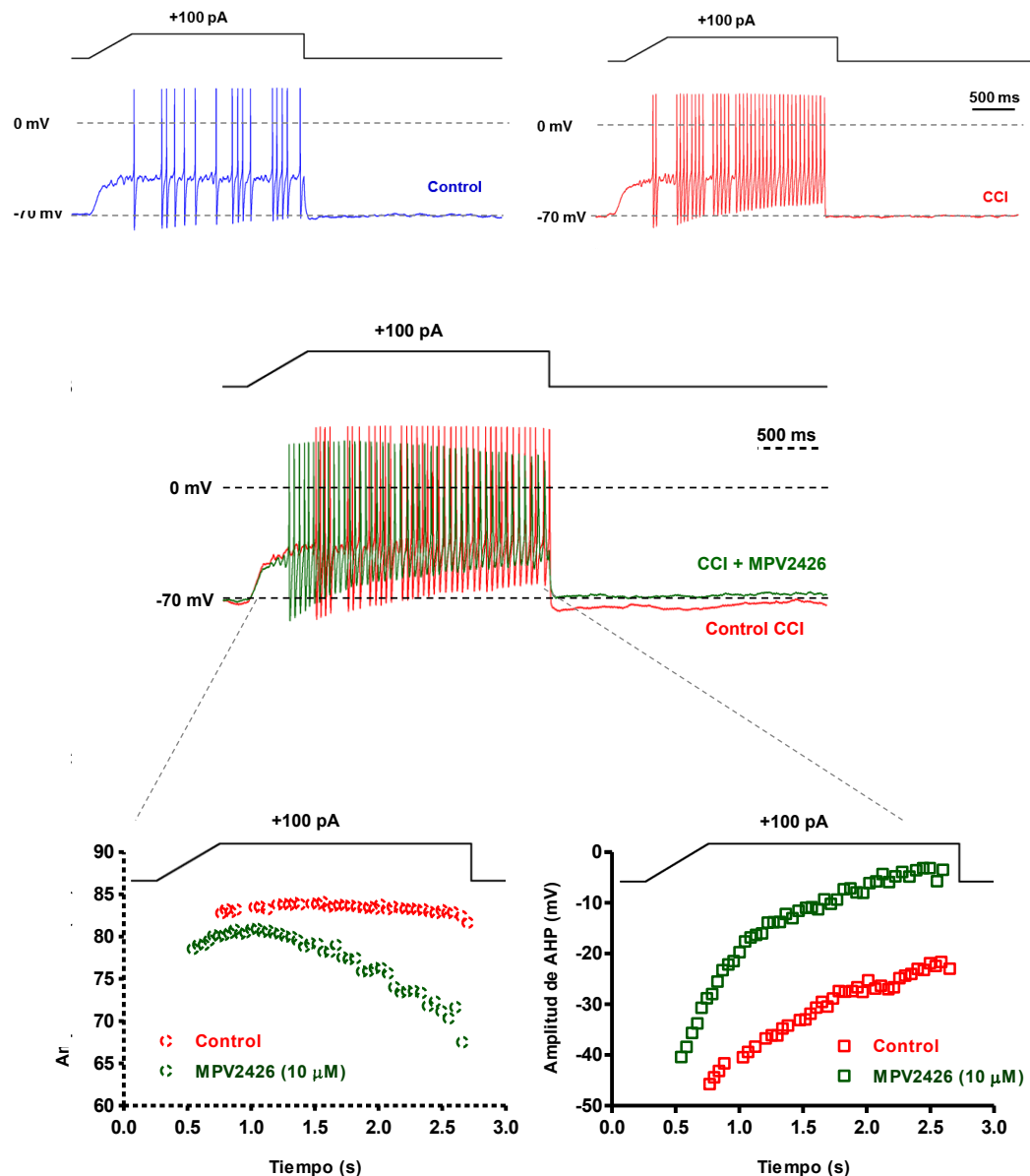


Figura 4.39. Efecto del MPV2426 sobre la excitabilidad de neuronas de los ganglios espinales (DRG) L5 y L6 de ratas con lesión (CCI) del nervio ciático y sus controles. **A.** Registros representativos de los cambios en el potencial de membrana inducidos por la inyección de corriente (ver protocolo en la parte superior de cada registro) en neuronas procedentes de animales **Control** ($n = 10$ células) y **CCI** ($n = 6$ células, $V_{\text{comm}} = -70$ mV). **B.** Efecto del **MPV2426** (10 μ M, 2 min.) sobre la actividad eléctrica de una neurona DRG procedente de un animal CCI ($n = 3$ células, 1 rata, $V_{\text{comm}} = -70$ mV). **C.** Curso temporal de la amplitud de los potenciales de acción y las posthiperpolarizaciones (AHPs), antes (**Control**) y después de la administración de **MPV2426** (10 μ M, 2 min.). Los datos corresponden a los resultados obtenidos de la neurona mostrada en **B**.

4.5. La contribución del sistema nervioso simpatoneural a la fisiopatología del dolor inducido por la CCI del nervio ciático

4.5.1. Efectos de la guanetidina sobre la alodinia mecánica y al frío

La guanetidina es un compuesto bloqueante neuronal simpático en razón de su capacidad para ser transportada al interior de las terminaciones nerviosas donde interaccionaría con las vesículas que almacenan NA disminuyendo progresivamente su liberación al medio extracelular. Dada su incapacidad para atravesar la BHE, constituye una herramienta adecuada para inducir una simpatectomía química y, consiguientemente, valorar la implicación del sistema nervioso simpatoneural en la fisiopatología de nuestro modelo de dolor neuropático (*Johnson et al.*, 1975).

La administración de guanetidina (50 mg/kg cada 24 h, I.P.) a animales CCI se inició el día 7 después de la cirugía y se mantuvo durante 4 días. Esta pauta posológica produjo una reversión progresiva de la alodinia mecánica que fue completa al tercer día de tratamiento sin que se observaran modificaciones en la alodinia al frío (**Figura 4.40**).

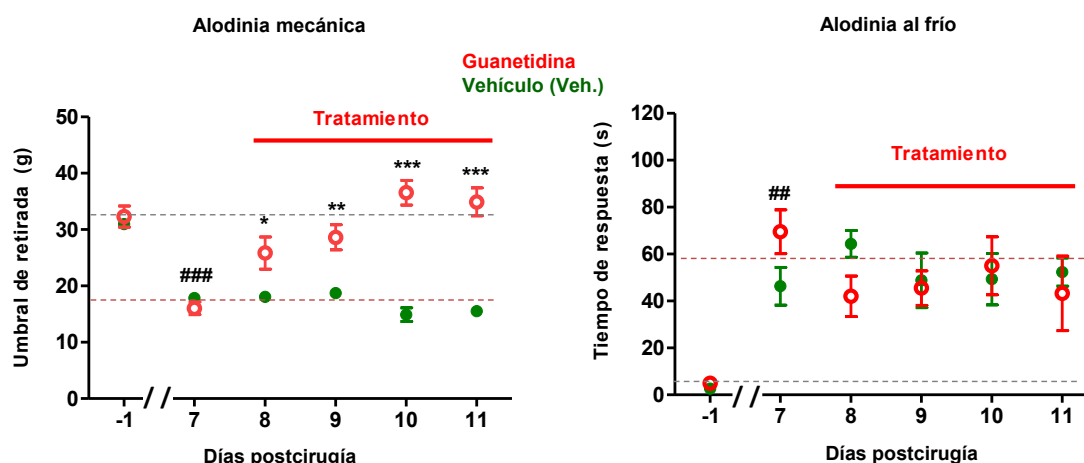


Figura 4.40. Efecto de guanetidina sobre alodinia mecánica y al frío. Se compararon los efectos de la administración de **guanetidina** (50 mg/kg, cada 24 h, I.P., n = 4 ratas) o de **vehículo** (Veh., solución salina, I.P., n = 6 ratas) a animales CCI. La administración comenzó el día 7 postcirugía y se prolongó durante 4 días consecutivos, valorándose en la extremidad lesionada las respuestas nocifensivas a la estimulación mecánica (*panel izquierdo*) o al frío (*panel derecho*) 24 h después de cada administración. Las líneas de rayas indican el umbral de retirada o el tiempo de respuesta correspondientes a la respuesta basal (-1; línea gris) o a la registrada a los 7 días postcirugía (línea roja). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. de los resultados obtenidos en cada grupo de animales. La significación estadística se estableció mediante un ANOVA de dos vías para medidas repetidas seguido de un test de Bonferroni para las comparaciones de tratamientos en momentos coincidentes (*: P < 0,05; **: P < 0,01; ***: P < 0,001). Así mismo, la significación estadística del efecto de CCI (7 días después de CCI) con respecto al valor basal (-1) se determinó mediante una prueba *t* de Student para muestras pareadas (##: P < 0,01; ###: P < 0,001).

4.5.2. Efecto de la guanetidina sobre el contenido adrenoglandular y los niveles circulantes de CAs

El tratamiento con guanetidina (50 mg/kg cada 24 h durante 4 días), aumentó el contenido de CAs tanto en las glándulas de los animales control ($10,39 \pm 1,42$ μ g/glándula de A y $1,84 \pm 0,29$

$\mu\text{g}/\text{glándula}$ de NA; $n = 12$ ratas) como CCI ($9,75 \pm 0,44 \mu\text{g}/\text{glándula}$ de A y $1,39 \pm 0,10 \mu\text{g}/\text{glándula}$ de NA; $n = 13$ ratas), sin modificar significativamente el cociente A-NA. Es de destacar que, después del tratamiento con guanetidina el contenido total de CAs fue mayor en las glándulas de los animales CCI ($18,11 \pm 0,68 \mu\text{g}/\text{glándula}$ de A y $3,21 \pm 0,25 \mu\text{g}/\text{glándula}$ de NA; $n = 7$ ratas) que en las de las ratas control ($14,99 \pm 3,79 \mu\text{g}/\text{glándula}$ de A y $3,07 \pm 0,60 \mu\text{g}/\text{glándula}$ de NA; $n = 3$ ratas), lo que sería compatible con una mayor biosíntesis CAs en las CCI (**Figura 4.41**).

Así mismo, la administración repetida de guanetidina se asoció a una marcada reducción de las CAs circulantes en ambos grupos de animales. Los valores de las concentraciones plasmáticas de A y NA junto al contenido total de las mismas (A + NA) aparecen representados en la **Figura 4.42** para las distintas condiciones experimentales. Cabe señalar que tras el tratamiento con guanetidina, se observó una disminución más pronunciada de los niveles de que de los de A, tanto en el grupo control como en el CCI, lo que se traduce en un aumento de la relación A-NA. En función de los resultados obtenidos, cabe pensar que la guanetidina ejerce un efecto inhibitor de la liberación de CAs más acusado sobre las terminaciones nerviosas noradrenérgicas que sobre las células cromafines (**Figura 4.42**).

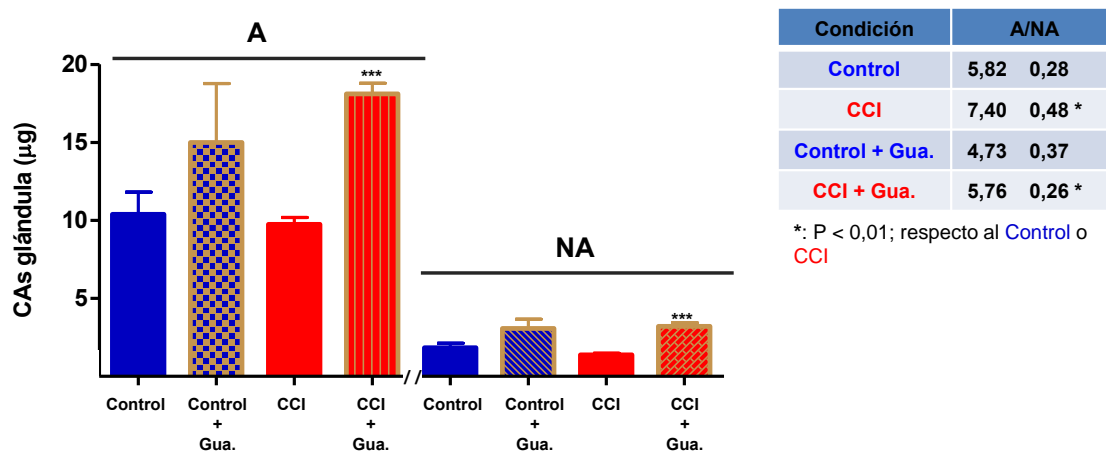


Figura 4.41. Efecto de la guanetidina sobre el contenido de adrenalina (A) y noradrenalina (NA) de la glándula adrenal de ratas. Panel izquierdo. Diagramas de barras de los contenidos de A y NA en glándulas adrenales de animales Control ($n = 12$ ratas) y CCI ($n = 7$ ratas). Así mismo, los animales fueron tratados con guanetidina (Gua., 50 mg/kg cada 24 horas durante 4 días, I.P) tanto en condición Control (Control + Gua., $n = 3$ ratas) y CCI (CCI + Gua., $n = 7$ ratas). Los datos se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. La significación estadística fue determinada mediante la prueba * de Student para muestras no pareadas. *: $P < 0,05$; ***: $P < 0,001$ se determinó con respecto a sus controles correspondientes sin tratamiento (Control o CCI). Panel derecho. Tabla que muestra la razón A-NA (A/NA) para las distintas condiciones experimentales.

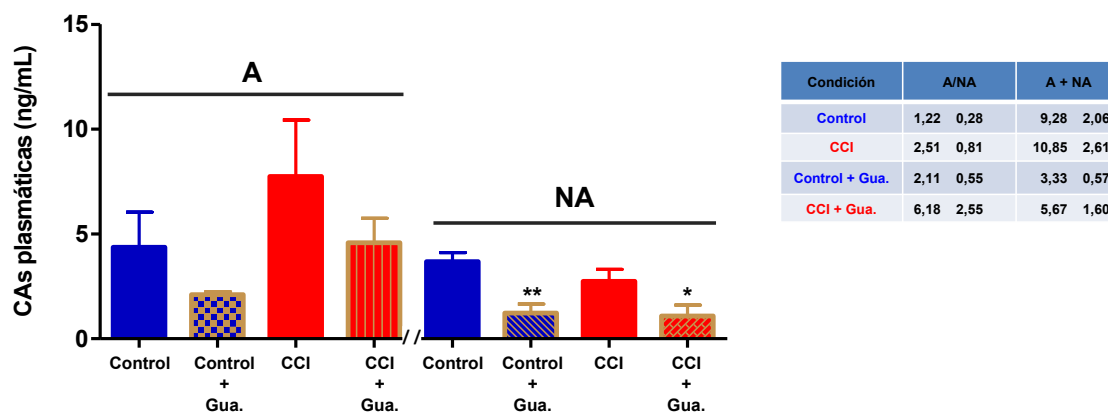


Figura 4.42. Efecto de la guanetidina sobre los niveles plasmáticos de adrenalina (A) y noradrenalina (NA). *Panel izquierdo.* Diagrama de barras de las concentraciones plasmáticas de A y NA en animales Control (n = 12 ratas) y CCI (n = 7 ratas) en situación control y tras el tratamiento con guanetidina (Gua., 50 mg/kg cada 24 horas durante 4 días, I.P., Control + Gua., n = 3 ratas, y CCI + Gua., n = 4 ratas). Los resultados se expresan como valores medios \pm S.E.M. para cada grupo experimental. La significación estadística se determinó mediante la prueba *t* de Student para muestras no pareadas. *: $P < 0,05$; **: $P < 0,01$; con respecto a sus controles correspondientes (Control o CCI). *Panel derecho.* La tabla muestra la razón A-NA (A/NA) y las CAs totales (A+NA) para las distintas condiciones experimentales.

4.6. Modulación catecolaminérgica de la nocicepción

Una de las hipótesis que se ha ido abriendo paso conforme se ha ido avanzado en la realización de este trabajo es la de que las CAs circulantes (la A y la NA) y la NA localmente liberada (a nivel de los ganglios espinales y probablemente a nivel de la piel por las terminaciones nerviosas de las neuronas noradrenérgicas) desempeñan un papel pronociceptivo en nuestro modelo de dolor neuropático.

Esta hipótesis fue verificada mediante la administración intraplantar de A, un agonista adrenérgico universal, en la extremidad trasera de ratas control (no operadas) seguida por la evaluación de la sensibilidad mecánica de la misma.

4.6.1. Efecto de la administración local de A sobre la sensibilidad mecánica en animales sanos

La administración intraplantar de A (100 ng, i.pl.; n = 12 ratas) en la extremidad posterior derecha de ratas control redujo un 75% el umbral de retirada de la extremidad ipsilateral frente a la estimulación mecánica, lo que confirma la acción algésica de esta catecolamina. La coadministración de A y prazosina (1 μ g, i.pl.; n = 12 ratas) un antagonista α_1 adrenérgico o atipamezol (100 ng, i.pl.; n = 6 ratas), revirtió prácticamente en su totalidad el efecto algésico inducido por la A. Por su parte, la coadministración con propranolol (1 μ g, i.pl.; n = 12 ratas), un antagonista β adrenérgico, incrementó el umbral de retirada ante el estímulo mecánico respecto al observado con A sola, alcanzándose valores similares a los obtenidos tras la administración de vehículo (Veh., solución salina, I.P.; n = 6 ratas). Ninguno de los antagonistas administrados por

vía intraplantar de forma aislada indujo modificaciones comportamentales indicativas de un efecto antinociceptivo en estos animales (**Figura 4.43**).

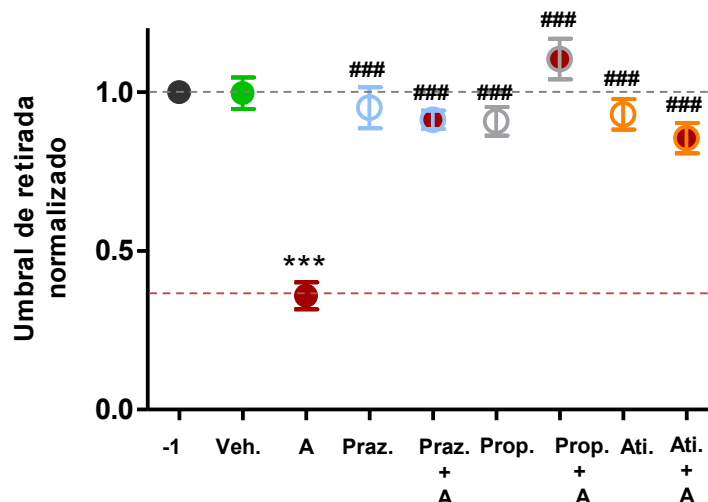


Figura 4.43. Efecto de la administración intraplantar de adrenalina y de su coadministración con distintos antagonistas adrenérgicos sobre la sensibilidad mecánica nociceptiva en animales sanos. Se representan los umbrales de retirada normalizados respecto a la respuesta basal (control basal; -1) en cada rata, tras la administración de vehículo (Veh., solución salina, i.pl. $n = 6$ ratas), adrenalina (A; 100 ng; $n = 12$ ratas), prazosina (Praz.; 1 μ g; $n = 12$ ratas), propranolol (Prop.; 1 μ g; $n = 12$ ratas) y atipamezol (Ati.; 100 ng; $n = 6$ ratas) y la coadministración de adrenalina con prazosina (Praz.+ A; $n = 6$ ratas), propranolol (Prop. + A; $n = 12$ ratas) o atipamezol (Ati. + A; $n = 6$ ratas). Los fármacos fueron administrados vía i.pl. en un volumen total de 20 μ L, valorando su efecto transcurrido un tiempo de 10 min. Las líneas gris y roja indican el umbral de retirada correspondiente a la respuesta basal (-1) y 7 días postcirugía. Los datos se expresan como valores medios normalizados \pm S.E.M. de cada grupo experimental. La significación estadística del efecto de la A respecto al vehículo se evaluó mediante una prueba *t* de Student de una sola muestra (***: $P < 0,001$). El efecto de los demás fármacos y sus combinaciones se comparó con el de A (###: $P < 0,001$).

4.6.2. Contribución de las CAs endógenas a la alodinia mecánica

El hecho de que tanto la guanetidina como el SKF29661 reviertan la alodinia mecánica en nuestro modelo de dolor neuropático sugiere la existencia de un tono catecolaminérgico endógeno que actuando directamente o indirectamente, sobre las terminaciones nerviosas próximas al punto de estimulación, contribuiría al aumento de la sensibilidad dolorosa. Para inferir su presencia se procedió a la administración intraplantar de prazosina (1 μ g; $n = 12$ ratas) y propranolol (1 μ g; $n = 18$ ratas) en la extremidad posterior de animales CCI y a la valoración de sus efectos sobre la sensibilidad mecánica. Nuestros resultados muestran una reversión parcial de la alodinia mecánica tras el bloqueo de receptores $\alpha 1$ y β adrenérgicos y el efecto sinérgico de la administración conjunta de los dos antagonistas, lo que evidenciaría la existencia de un tono simpático endógeno que, vía dichos receptores adrenérgicos, contribuiría a la alodinia mecánica de los animales CCI (**Figura 4.44**).

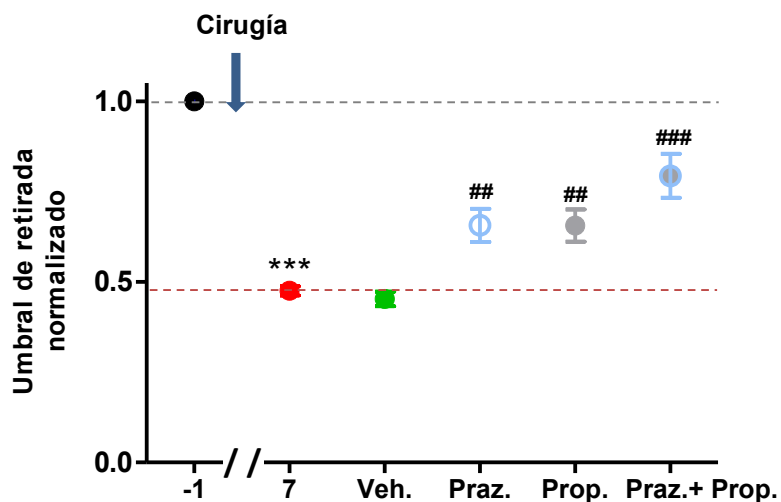


Figura 4.44. Efecto de la administración intraplantar de adrenalina y de su coadministración con antagonistas adrenérgicos sobre la alodinia mecánica. Se representan los umbrales de retirada normalizados respecto a la respuesta basal (control basal; -1), tras la administración de vehículo (Veh., solución salina), prazosina (Praz., 1 µg; n = 12 ratas), propranolol (Prop., 1 µg; n = 18 ratas) y la coadministración de ambos antagonistas adrenérgicos (Praz. + Prop.; n = 12 ratas) en animales CCI. El dígito 7, representa la respuesta de los animales 7 días después de la cirugía. Los fármacos fueron administrados vía i.pl. en un volumen total de 20 µL, valorando su efecto transcurrido un tiempo de 10 min. Las líneas gris y roja indican el umbral de retirada correspondiente a la respuesta basal (-1) y 7 días postcirugía. Los datos se expresan como valores medios normalizados ± S.E.M. de cada grupo experimental. La significación estadística del efecto de la cirugía respecto al valor basal (1 día antes de CCI; -1) se evaluó mediante una prueba *t* de Student de una sola muestra (***: $P < 0,001$). El efecto de los demás fármacos y sus combinaciones se comparó con el del vehículo (###: $P < 0,001$).

V. DISCUSIÓN

“El dolor tiene un gran poder educativo; nos hace mejores, más misericordiosos...”
Cesaré Cantú

El presente trabajo se encuadra en una línea de investigación que aspira a identificar nuevas dianas terapéuticas para el dolor crónico neuropático. Ello conlleva necesariamente la utilización de modelos experimentales y frecuentemente también la indagación en la fisiopatología de la enfermedad en el(los) modelo(s) elegido(s). Además, la validación de la diana implica llevar a cabo una prueba de concepto en la que se compruebe la eficacia antinociceptiva de un fármaco activo sobre la diana en cuestión.

La hipótesis de partida de este trabajo fue la de considerar al dolor crónico como un estresor capaz de originar una respuesta de estrés que, a su vez, contribuyera a la fenomenología dolorosa, cerrando así un círculo vicioso por el que el dolor y el estrés se alimentan de forma recíproca. Dada la complejidad de las respuestas de estrés y del sustrato orgánico que las posibilitan, se hacía necesario acotar los elementos del mismo. Nuestro estudio se ha centrado en el papel del SNS en las respuestas de estrés crónico y, más concretamente, en el del sistema simpatoadrenal. Tres razones justificaron dicha elección: i) la experiencia del equipo investigador en el estudio de la fisiología de la médula adrenal; ii) el hallazgo de que la médula adrenal sufre cambios adaptativos durante el estrés crónico, y iii) la menor atención relativa que se ha prestado al estudio del sistema simpatoadrenal respecto al simpatoneural en lo que se refiere a la contribución del SNS al dolor crónico.

Por consiguiente, esta Discusión adoptará una estructura parecida a la de la sección de Resultados, de forma que se abordarán sucesivamente el modelo de dolor utilizado, su impacto sobre la función del sistema simpatoadrenal y la participación de dicho sistema en la fenomenología dolorosa. La discusión de este último aspecto se realizará a partir de los resultados obtenidos con dos tipos de fármacos (inhibidores de la PNMT y agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos) capaces de modificar la función de las células cromafines de la médula adrenal y/o el comportamiento nocifensivo de los animales. La existencia de una relación entre ambos tipos de efectos es el primer paso en el proceso de validación de sus respectivas dianas.

5.1. Implementación del modelo de dolor neuropático

El modelo experimental debe escogerse en razón del problema que se desea estudiar. Nuestro modelo, la CCI del nervio ciático es un modelo clásico de dolor consistente en la producción de una lesión a un nervio periférico (*Bennett y Xie, 1988; Boyce-Rustay y Jarvis, 2009*). La lesión origina cambios en la función (actividad ectópica, aumento de la excitabilidad) de las neuronas nociceptivas primarias conducentes a la sensibilización central de la vía nociceptiva, lo que se manifiesta en forma de dolor espontáneo, hiperalgesia y alodinia típicos del dolor neuropático. Nuestro modelo se caracteriza por no producir la desconexión total de los tejidos inervados por las neuronas nociceptivas respecto de la médula espinal (*Lin et al., 2001*). Ello es debido a que las ligaduras que se aplican sobre el tronco nervioso conducen a la degeneración de aproximadamente el 80% de las fibras sensitivas mielínicas (fibras de tipo A β) y del 60% de las amielínicas (fibras de tipo C); además, las ligaduras se producen distalmente a la bifurcación de algunas fibras del nervio ciático que, por lo tanto, no se verían afectadas por las mismas (*Basbaum et al., 1991*). Si bien el dolor espontáneo es generalmente atribuido al incremento de la actividad ectópica en los somas de las neuronas dañadas (*Liu et al., 1999*), la alodinia y la hiperalgesia se relacionan con la activación de las terminaciones periféricas de las neuronas supervivientes. Mientras que la hiperalgesia parece obedecer a una respuesta exagerada de las neuronas nociceptivas como consecuencia de fenómenos de sensibilización periférica ligados a la existencia de reflejos dorsoespinales inductores de inflamación neurogénica, con la consiguiente liberación de sustancias sensibilizantes (PGs) y algógenas (BC) y de cambios en la expresión y propiedades de proteínas transductoras de la nocicepción (p.ej., canales TRPV1), no está clara en la actualidad la base celular de la alodinia. Aunque no se descarta la participación de fibras nociceptivas (*Nagi et al., 2011*), predomina la idea de que sería debida a la activación de fibras de tipo A β que a nivel de la médula espinal harían sinapsis con neuronas nociceptivas secundarias ocupando el lugar de las neuronas nociceptivas primarias destruidas por la constricción del nervio ciático.

Adicionalmente, es bien conocido que en dicho modelo se produce un incremento de las fibras simpáticas postganglionares tanto en la piel inervada por las fibras sensitivas del nervio ciático (*Yen et al., 2006*) como en los ganglios espinales lumbares en los que se ubican sus somas (*Chung et al., 1996*); en paralelo, aunque se trata de fenómenos temporal y mecanísticamente distintos, se ha descrito el aumento de la expresión de diversos tipos de receptores adrenérgicos en distintas regiones (terminaciones centrales y periféricas, somas) de las neuronas nociceptivas primarias, así como en otras células (queratinocitos, macrófagos) que mediante la liberación de mensajeros extracelulares, pueden también influir en la actividad de dichas neuronas (*Liu et al., 1999; Cheng et al., 2014*). Ambos fenómenos determinan que sea posible modificar el comportamiento nocifensivo de los animales afectados mediante intervenciones como la estimulación

transcutánea de las fibras simpáticas, la simpatectomía (química, local o generalizada, o quirúrgica) o la administración de muy diversos fármacos con afinidad por los receptores adrenérgicos (*Chen et al., 1996; King et al., 2005; Donello et al., 2011; Segall et al., 2012; Li et al., 2013*). Se trata, en suma, de un modelo en el que la sintomatología dolorosa estaría mantenida por la actividad del sistema simpátoneural y que, consiguientemente, puede tener cierta similitud con cuadros clínicos humanos como el SDRC que actualmente engloba una serie de condiciones que antiguamente se denominaba con los términos de causalgia o distrofia simpática refleja (*Bruehl, 2010*).

Nuestros resultados relacionados con la implementación del modelo experimental de dolor concuerdan en lo siguiente con lo que aparece referido la literatura:

a) Presencia de alodinia mecánica y al frío así como hiperalgesia mecánica; además, el carácter crónico del cuadro doloroso se evidenciaría por la constancia y curso temporal de dichas manifestaciones. A este respecto, cabe señalar que el hecho de que la alodinia al frío decline más rápidamente que la mecánica indicaría que ambas modalidades sensitivas están mediadas por fibras nerviosas distintas. Por último y en relación con el procedimiento utilizado para producir la lesión del nervio ciático, nos gustaría dejar constancia de que en nuestras manos (en virtud de la pericia de la cirujana y del adecuado cálculo de las dosis de la combinación anestésica) la mortalidad asociada al mismo fue prácticamente nula, mientras que la casi totalidad de los animales intervenidos desarrollaron la sintomatología propia del dolor neuropático, con un mínimo porcentaje de individuos presentando autotomía (automutilación).

b) Las neuronas DRG de los ganglios L5 y L6 ipsilaterales a la lesión nerviosa muestran una mayor frecuencia de descarga de potenciales de acción en respuesta a la inyección de corriente. Este aumento de la excitabilidad se asoció a una disminución de la amplitud de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje, lo que condiciona la existencia de AHPs de menor amplitud y, en consecuencia, intervalos más breves entre potenciales de acción consecutivos (*Hogan, 2007*). Si bien nuestros resultados concuerdan con los de trabajos previos en relación a la inexistencia de cambios en la amplitud de las corrientes a través de los canales Na_v , también han sido ampliamente descritas las modificaciones en la tipología de los mismos y que consisten en la reducción de la expresión de canales Na_v resistentes a TTX y el aumento concomitante de la expresión de canales Na_v sensibles a dicha toxina (*Dib-Hajj et al., 1999; Blair y Bean, 2002; Laedermann et al., 2015*). Los primeros generan corrientes de Na^+ lentamente inactivantes responsables de la larga duración de los potenciales de acción de las neuronas nociceptivas y de una corriente ventana (*window current*) despolarizante (lleva el potencial de membrana a valores comprendidos entre -60 y -20 mV) que mantiene inactivados al resto de canales Na_v . La práctica desaparición de este tipo de canales en las neuronas lesionadas supone la hiperpolarización de la membrana celular y,

consecuentemente, el aumento de la disponibilidad de canales de Na_v sensibles a TTX, cuyo rasgo fundamental desde el punto de vista biofísico es la rapidez con la que se recuperan de la inactivación (*repriming*). Ambos fenómenos, reducción de la corriente de Ca^{2+} y cambio en las características de la de Na^+ subyacen al aumento de la actividad ectópica de las neuronas DRG en las neuropatías periféricas. Dicha actividad no solo incrementa la llegada de potenciales de acción a las terminaciones centrales de las neuronas nociceptivas sino que en el núcleo de la célula también activa la transcripción de genes codificantes de distintas moléculas (neuropéptidos como el CGRP, canales TRV1, etc.), implicadas a nivel presináptico en la potenciación de la transmisión nociceptiva en la médula espinal.

c) Hiperinervación simpática (inmunorreactividad a la TH) y aumento de la expresión de receptores P2X3 en los ganglios espinales correspondientes al nervio ciático lesionado (*Ramer y Bisby, 1997; Xiang et al., 2008*). Se trata de un fenómeno ampliamente descrito que se ha relacionado con la liberación de NGF por células de tipo inflamatorio y cuya significación funcional no ha sido completamente esclarecida (*McLachlan et al., 1993; Michaelis et al., 1996; Jänig et al., 1996*). Ello se debe al número relativamente bajo de fibras nerviosas que aparecen, a la lentitud con la que lo hacen y al hecho de hacerlo fundamentalmente en la vecindad de los somas neuronales de mayor tamaño, cuya participación en la señalización nociceptiva para muchos autores es dudosa. Por otra parte, el aumento de la expresión de los receptores purinérgicos P2X3 en las neuronas DRG daría lugar a despolarizaciones de mayor amplitud en respuesta al ATP liberado por las células satélite (*Sharp et al., 2006; Wirkner et al., 2007; Huang et al., 2013*), lo que favorecería la descarga espontánea de potenciales de acción (actividad ectópica).

d) Aumento en la sensibilidad adrenérgica de las neuronas DRG. Este fenómeno se ha relacionado con una mayor expresión de los receptores $\alpha 1$ y $\alpha 2$ adrenérgicos en el soma y posiblemente también en las terminaciones de dichas neuronas (*Birder y Perl, 1999*); el aumento de la sensibilidad a los agonistas $\alpha 2$ adrenérgicos será objeto de comentario más adelante.

e) Existencia de un tono simpático algógeno en la planta del pie de la extremidad ipsilateral a la lesión nerviosa. Dicho tono se evidencia por el efecto antialodínico de los antagonistas adrenérgicos administrados localmente y estaría mediado por receptores $\alpha 1$ y β adrenérgicos, cuya localización celular no ha sido objeto de estudio en este trabajo. Su existencia implica la activación de dichos receptores por CAs endógenas, tanto circulantes (A) como localmente liberadas (NA). Esta circunstancia explicaría por sí misma el efecto antialodínico de la simpatectomía química con guanetidina y/o de las intervenciones que limiten la liberación de CAs por la médula adrenal (véase más adelante). En este punto resulta, por tanto, oportuna una breve mención de los resultados obtenidos con guanetidina. Su efecto antialodínico mecánico se instaura de forma progresiva, probablemente conforme se agotan los depósitos de NA en las terminaciones nerviosas simpáticas

postganglionares. Ello queda reflejado en la marcada disminución de los niveles circulantes de NA observada tanto en los animales control como con dolor neuropático. Llama, no obstante, la atención la disminución también de las concentraciones plasmáticas de A en ambos grupos de animales. Se trata de un hallazgo inesperado que plantea la posibilidad de una acción a nivel de la médula adrenal conducente al incremento del contenido de ambas CAs en las glándulas adrenales observado en los animales tratados con guanetidina. Se ha descrito que la guanetidina inhibe la entrada de Ca^{2+} (CI_{50} de 27 μM) y la secreción de CAs inducida por distintos agonistas nicotínicos en las células cromafines bovinas (Gandía et al., 1991; Sorimachi et al., 1994). De confirmarse este efecto bloqueante ganglionar en nuestra preparación cabría considerar a la guanetidina como un fármaco con efecto simpaticolítico periférico general y no solo circunscrito al sistema simpatoeural. Debe señalarse, finalmente, que la hiperinervación simpática que puede acontecer en la piel de las extremidades afectas por la ligadura del nervio ciático es compatible con la existencia de un tono adrenérgico algógeno cutáneo en dichos animales, pero no constituye un requisito para la misma dado que dicho tono podría producirse también por la sobreexpresión (o la modificación de sus vías de señalización) de receptores adrenérgicos a ese nivel o el incremento de la actividad del sistema simpatoadrenal.

5.2. La CCI del nervio ciático como modelo de estrés: participación del sistema simpatoadrenal

La implementación de este modelo nos ha permitido verificar la primera de las proposiciones de la hipótesis de partida de este trabajo, a saber, que el dolor crónico comporta una respuesta de estrés que, es importante indicar, sería independiente de los cambios en la innervación simpática postganglionar que acabamos de referir. La evaluación de la respuesta de estrés se realizó mediante la determinación de una serie de parámetros anatómicos (tamaño de los animales y de las glándulas adrenales, innervación de la glándula adrenal), bioquímicos (niveles de CAs en las glándulas adrenales y el plasma) y funcionales (transmisión sináptica en la unión esplacno-cromafín, conductancias iónicas implicadas en el acoplamiento excitación-secreción, y respuesta exocitósica de las células cromafines) tanto en los animales con dolor neuropático como controles (animales no operados o *Sham*) o expuestos a un estresor bien conocido como es el frío (4 °C durante 5 días). Respecto a los controles, en los animales CCI se observaron una serie de modificaciones estructurales y funcionales en la médula adrenal (incremento de la innervación colinérgica, aumento de la actividad sináptica espontánea, incremento de la magnitud de las corrientes nicotínicas y de la contribución a las mismas de los nAChRs $\alpha 9^*$, mayor respuesta exocitósica inducida por la entrada de Ca^{2+}) en gran medida coincidentes con las observadas en el modelo de estrés crónico por frío y que posibilitarían una mayor respuesta secretora de CAs (Colomer et al., 2008; 2010). Esta última circunstancia posiblemente habría quedado reflejada en el

menor contenido en CAs de las glándulas adrenales de los animales con dolor neuropático y estresados por frío.

Aunque los niveles circulantes de CAs, y en particular de A, son considerados un buen indicador de la actividad simpatoadrenal, sin embargo, no es una tarea sencilla relacionar los mencionados cambios en el contenido de CAs en la médula adrenal sobre dichos niveles. Para abordar adecuadamente este problema se hubiera requerido la monitorización continua o semicontinua de niveles plasmáticos de CAs en animales conscientes a los que se les hubiese implantado un catéter venoso conectado a una cánula de la que se tomaran muestras de sangre sin perturbar a los animales (*Kvetnansky et al., 1978*). Nuestra aproximación, dada la dificultad de dicho abordaje, fue distinta: por una parte, constatamos que en animales anestesiados no existen diferencias en las concentraciones plasmáticas de CAs entre el grupo CCI y el control (no operado), lo cual resulta compatible con un efecto simpaticolítico a nivel central del anestésico utilizado (isoflurano; *Garofalo et al., 2012*); por la otra, evaluamos la repercusión sobre los niveles circulantes de CAs de un estresor agudo de intensidad máxima, como es la decapitación. En los animales control, este estímulo multiplicó por un factor de 6 la cifra de CAs totales circulantes e invirtió el cociente A-NA, lo que sugiere una liberación masiva de A por la médula adrenal en línea con lo descrito en la literatura (*Kvetnansky et al., 1978*). En los animales CCI y en los estresados por frío se observó un aumento no significativo de las concentraciones de CAs circulantes y un incremento del ratio A-NA más pronunciado en el caso de los animales CCI, indicativo de una mayor participación del sistema simpatoadrenal en la respuesta de estrés agudo en ellos. Los resultados obtenidos en los animales estresados por frío son similares a los reportados previamente, si bien la elevada variabilidad interindividual posiblemente nos ha impedido obtener la deseable significación estadística (*Colomer et al., 2010*). Debe señalarse, por otra parte, que la respuesta a un estímulo agudo como la decapitación además de estar condicionada por la reserva de CAs existente en la glándula adrenal, puede muy bien no reflejar los niveles circulantes de CAs frente a estímulos crónicos y de menor intensidad como sería el caso del dolor neuropático.

5.3. Influencia del sistema simpatoadrenal sobre la fenomenología del dolor neuropático

Respecto a la segunda proposición de la hipótesis de partida, la relacionada con la contribución del estrés a las manifestaciones del dolor crónico, nuestros resultados apuntan claramente a la participación de la médula adrenal en virtud de la capacidad del SKF29661 para revertir la alodinia mecánica y al frío en los animales CCI. El SKF29661 es un inhibidor reversible y competitivo de la PNMT, la enzima que convierte la A en NA (*Pendleton et al., 1979*). A tenor de su acción selectiva sobre la enzima (carece de efecto sobre receptores $\alpha 1$, $\beta 1$ y $\beta 2$ adrenérgicos, la TH y la COMT, así como sobre los canales Na_v , Ca_v , K_v y nAChRs de las células cromafines;

Pendleton et al., 1979; 1982; resultados del presente trabajo), su incapacidad para atravesar la barrera hematoencefálica y la localización preferentemente adrenal de la PNMT, consideramos que su efecto puede calificarse de adrenomedulectomía química. En consonancia con su mecanismo de acción, el tratamiento con SKF29661 (300 mg/kg durante 4 días) de los animales control se asoció a cambios especulares (aumento de la NA y disminución de la A) del contenido adrenoglandular y de los niveles circulantes de las dos CAs. En los animales CCI, el tratamiento con SKF29661 se acompañó también de un aumento del contenido glandular y de la concentración plasmática de NA. Sorprendentemente, se observó un aumento del contenido glandular de A que no tuvo correspondencia en los niveles circulante de dicha CA. La inducción de las enzimas de la ruta biosintética de las CAs es un suceso común a muy diferentes formas de estrés (*Sabban y Kvetnansky, 2001; Tai et al., 2007*). Mediante el aumento de la síntesis se pretende satisfacer las demandas aumentadas de CAs en dichas situaciones. En lo que se refiere a la PNMT, el mecanismo involucrado en el aumento de su actividad es el incremento de la expresión de la enzima, la cual se encuentra bajo el control de los esteroides suprarrenales y de la actividad en la unión esplacno-cromafín (acoplamiento excitación-síntesis de CAs; *Wong, 2006*). Por ello, creemos que en situaciones de estrés como la que representa el dolor inducido por la CCI del nervio ciático se produciría una sobreexpresión de la PNMT y, consiguientemente, la reducción del efecto de un inhibidor competitivo de la misma como es el SKF29661. El aumento del ratio A-NA en los animales CCI y del contenido glandular de NA en los animales CCI tratados con SKF29661 con respecto a los animales control también bajo tratamiento con SKF29661 es coherente con la interpretación propuesta.

El efecto antialodínico mecánico de SKF29661 fue de rápida instauración (30 min. post-administración) y reversible al retirar el tratamiento. La rapidez de instauración del efecto es compatible con la idea bien asentada en la literatura de que los gránulos de secreción más recientemente formados, y en los que presumiblemente se acumulan las últimas CAs sintetizadas, son los primeros que son liberados por las células cromafines cuando son estimuladas (*Duncan et al., 2003*). Esta circunstancia determina nuevamente que la elevación de los niveles circulantes de CAs en respuesta a una estimulación aguda de elevada intensidad (decapitación) no sean los mejores indicadores del efecto de un fármaco como el SKF29661 sobre la secreción adrenomedular de CAs en animales sometidos a un estrés crónico de mucha menor intensidad que posiblemente solo movilice a los gránulos de formación más reciente. Por otra parte, la reversibilidad del efecto antialodínico de SKF29661 tras la retirada del mismo es congruente con el carácter reversible de la inhibición enzimática, e indicativo de que el tratamiento, al menos con la posología utilizada, no modifica el curso de la enfermedad. Finalmente, la mayor eficacia del SKF29661 para revertir la alodinia mecánica que al frío sugiere la participación de mecanismos, y no solo de fibras nerviosas, diferentes en la fisiopatología de ambas sensaciones.

A lo largo de esta discusión se ha considerado implícitamente que el mecanismo fundamental del efecto antialodínico del SKF29661 es la inhibición de la síntesis y liberación de A por las células cromafines de la médula adrenal. Ello implica, como consecuencia, que dicha CA es capaz de ejercer un efecto nociceptivo. En un intento de confirmar esta posibilidad decidimos administrar A locamente en la planta del pie de ratas control y tras comprobar que, en efecto, aumentaba notablemente la sensibilidad a los estímulos mecánicos, procedimos a investigar los tipos de receptores implicados en su efecto algésico mediante la coadministración de antagonistas adrenérgicos selectivos. Los resultados obtenidos indican que los receptores $\alpha 1$, $\alpha 2$ y β median dicho efecto. Llama, no obstante, la atención que el bloqueo de cualquiera de ellos baste para elevar el umbral de la respuesta nocifensiva hasta valores similares a los que se observan tras la administración del vehículo, de lo que se deduce que la activación de todos ellos es necesaria para que la A ejerza su efecto algésico. Estos resultados difieren en dos aspectos de los obtenidos al estudiar el tono algógeno adrenérgico cutáneo de los animales CCI: en éste último solo aparecen implicados los receptores $\alpha 1$ y β adrenérgicos pero no los $\alpha 2$ adrenérgicos, ya que el atipamezol (100 ng, **Figura 4.35**) carece de efecto antialodínico; además, los antagonistas de los receptores $\alpha 1$ (prazosina) y β (propranolol) adrenérgicos presentan efectos aditivos (*Drummond et al., 2014*). Aunque el experimento consistente en la administración local de A posibilita evidenciar el efecto nociceptivo de esta CA, resulta ciertamente difícil reproducir con este tipo de diseño el efecto de las concentraciones circulantes de A, y más aún, las de los animales con CCI del nervio ciático.

En conjunto, los resultados obtenidos mediante el uso de SKF29661 permiten considerar a la PNMT de las células cromafines como una nueva diana para el tratamiento de aquellos cuadros de dolor crónico en los que la activación del sistema simpatoadrenal desempeñe un papel fisiopatológico relevante. Dicha diana presentaría la ventaja de contar actualmente con fármacos inhibidores selectivos de acción periférica dotados de una elevada seguridad (*Pendleton et al., 1982*).

5.4. Los receptores $\alpha 2$ adrenérgicos periféricos como dianas de fármacos analgésicos en el dolor neuropático

La otra diana a la que hemos prestado atención en este trabajo es el receptor $\alpha 2$ adrenérgico. Los agonistas de estos receptores ejercen un notable efecto analgésico modulando la transmisión sináptica entre la primera y segunda neuronas de la vía nociceptiva. Se trata de un efecto a nivel de la médula espinal que se observa de forma aislada (en ausencia de efecto sedante y simpaticolítico de acción central) tras la administración espinal de estos compuestos. Sin embargo, la existencia de receptores $\alpha 2$ adrenérgicos moduladores de la liberación de NA por las terminaciones nerviosas de las fibras simpáticas postganglionares y de A por las células cromafines de la médula adrenal plantea la existencia de dianas periféricas de estos fármacos que pudieran

contribuir a su efecto analgésico en situaciones, como la que ejemplifica nuestro modelo experimental, en la que una mayor actividad simpática contribuyera a las manifestaciones dolorosas. Los resultados obtenidos tras la administración sistémica (I.P.) de dexmedetomidina y MPV2426 confirmaron el efecto antialodínico mecánico y al frío de ambos compuestos a dosis no sedantes, lo que indicaría que se ejerce fuera del SNC, mientras que los experimentos *in vitro* demostraron su capacidad para inhibir la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v y la exocitosis en las células cromafines a concentraciones clínicamente relevantes (100 nM). Es importante señalar que ambos efectos dependen de la activación de receptores α_2 adrenérgicos, pues fueron prevenidos o revertidos por atipamezol. Adicionalmente, el hecho que en los animales tratados con MPV2426 se observe un incremento del contenido adrenoglandular de CAs es compatible con el mencionado efecto inhibitorio de la liberación de CAs. Tanto el efecto sobre el comportamiento nocifensivo como sobre la inhibición de la entrada de Ca^{2+} y la exocitosis en las células cromafines es propio o se encuentra acentuado en los animales con dolor neuropático, en consonancia con un incremento de la actividad del SNS en los mismos. Una de las más claras manifestaciones del incremento de dicha actividad a nivel de la médula adrenal es la mayor frecuencia de sEPSCs, que se vio drásticamente inhibida por la dexmedetomidina actuando probablemente sobre receptores α_2 adrenérgicos localizados en las terminaciones del nervio esplacnico. En consecuencia, la médula adrenal presentaría propiedades idóneas para la actuación de los agonistas α_2 adrenérgicos de una forma que podría denominarse como “dependiente de actividad”.

Sin embargo, el hecho de que la administración local por vía i.pl. de dexmedetomidina y MPV2426 induzca también un efecto antialodínico sensible a atipamezol indica que los receptores α_2 adrenérgicos adrenomedulares no son necesariamente las dianas implicadas en el efecto antialodínico de dichos fármacos. Se hace por ello necesario tomar en consideración al menos otras dos localizaciones celulares de los receptores α_2 adrenérgicos capaces de influir en el comportamiento nocifensivo: las fibras nerviosas simpáticas postganglionares y las neuronas nociceptivas primarias (DRG). La participación de los receptores α_2 adrenérgicos de las fibras nerviosas simpáticas postganglionares no ha sido objeto directo de nuestra investigación, si bien el efecto antialodínico de la guanetidina y la condición de autoreceptor inhibitorio de la liberación de NA de los receptores α_2 adrenérgicos los convertiría en firmes candidatos al papel de mediadores del efecto antialodínico de los agonistas α_2 adrenérgicos en nuestro modelo experimental. Por otra parte, nuestro trabajo ha confirmado la capacidad de los agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos para modificar especialmente la excitabilidad de las neuronas DRG procedentes de animales con dolor neuropático (*Abdulla y Smith, 1997*). Resulta, no obstante, difícil saber cuál es la participación en el efecto antialodínico de los agonistas α_2 adrenérgicos de los receptores localizados en el soma de dichas neuronas. De acuerdo a nuestros resultados y a los datos publicados en la literatura, dichos receptores mediarían, al menos de forma instantánea, un aumento

de la excitabilidad neuronal relacionado con la inhibición de la corriente de Ca^{2+} dependiente de voltaje; sin embargo, la disminución de la AHP que producen debería condicionar una menor recuperación de la inactivación de los canales Na_v , lo que como nuestros registros sugieren conduciría rápidamente al bloqueo por despolarización de la descarga de potenciales de acción.

En resumen, los resultados de nuestro estudio indican que en nuestro modelo de dolor neuropático es posible desarrollar una acción antinociceptiva mediante el uso de fármacos (inhibidores de la PNMT y agonistas α_2 adrenérgicos) que inhiban el tono adrenérgico algésico actuante sobre las terminaciones nociceptivas de la superficie plantar de la extremidad lesionada de los animales. Debe señalarse que la probable disminución de la concentración de A y NA producido tanto por los inhibidores de la PNMT como por los agonistas de los receptores α_2 adrenérgicos podría traducirse en una menor activación de los receptores α_1 , α_2 y β adrenérgicos que a nivel de las fibras nerviosas nociceptivas, las simpáticas postganglionares, los queratinocitos y macrófagos mediarían los efectos nociceptivos de las CAs (Khasar *et al.*, 1999). En lo que respecta a los agonistas α_2 adrenérgicos de acción periférica, cabe proponer una posible actuación a 3 niveles para reducir la transmisión de la información nociceptiva: i) las células cromafines de la médula adrenal; ii) las terminaciones nerviosas noradrenérgicas, y iii) las terminaciones nerviosas periféricas (nociceptores) y los somas de las neuronas nociceptivas primarias (DRG).

Las células cromafines de la médula adrenal constituyen una diana particularmente atractiva en la medida en que su actividad está directamente relacionada con las respuestas de estrés y el hecho de que la A es un compuesto capaz de actuar con carácter sistémico (hormona). El primer aspecto vincularía al sistema simpatoadrenal (y quizás también el eje HPA) con una serie de cuadros de dolor generalizado como la fibromialgia, el síndrome de cansancio crónico o el síndrome del intestino irritable, cuya sintomatología se acentúa típicamente en situaciones de estrés (Jänig y Baron, 2007); el segundo, involucraría a la A en cuadros dolor en los que no se produjera una remodelación de la inervación simpática (p. ej., dolor inflamatorio articular), pero en los que dicha CA fuera capaz de modificar el cuadro clínico actuando sobre receptores adrenérgicos (fundamentalmente del tipo β) localizados en estructuras del tejido afectado (p. ej., los sinoviocitos; Zautra *et al.*, 2007).

Nuestro trabajo ha evidenciado también la capacidad de la dexmedetomidina y el MPV2426 para bloquear los canales Na_v a concentraciones micromolar. Se trata de un efecto de tipo anestésico local compartido por la NA y, posiblemente, también por el atipamezol, que coadyuvaría o incluso daría cuenta del efecto analgésico de estos fármacos cuando son administrados localmente (Maruta *et al.*, 2011).

5.5. Consideraciones finales y perspectivas

El dolor es un síntoma que acompaña a muy diversas enfermedades pudiendo también constituir por sí mismo una enfermedad, como suele ser el caso del dolor neuropático. La enorme diversidad de modelos animales y resultados frecuentemente contradictorios de los estudios experimentales no hace sino abundar en la idea de que aún existen importantes lagunas en el conocimiento de la fisiopatología del mismo. El dolor crónico es además un proceso dinámico en cuya evolución y expresión intervienen la práctica totalidad de los sistemas responsables de la homeostasia (sistema nervioso autónomo –divisiones simpática y parasimpática–, sistema nervioso motor y sensitivo –somático y visceral–, sistema endocrino, sistema inmune) bajo la regulación de múltiples estructuras del SNC. Son muchas las variables que determinan los equilibrios entre todos estos sistemas y que se verán modificados en los distintos modelos experimentales de dolor. Uno de los sistemas con mayor grado de variabilidad (también podría denominarse plasticidad adaptativa) es el SNS, en el que habría que diferenciar las estructuras propiamente nerviosas de las de los órganos efectores y tomar en consideración la amplia y variada distribución de los 9 tipos de receptores adrenérgicos existentes. Resulta por tanto plausible creer que los distintos elementos del mismo estén sujetos a modificaciones diferenciadas en función del tipo e intensidad de la respuesta de estrés que cada modelo de dolor lleve aparejada, lo que determinará que las dianas relevantes para una intervención farmacológica (receptores adrenérgicos adrenomedulares, simpátoneurales, del sistema nociceptivo, de las células del sistema inmune, etc.) puedan variar en función del modelo animal y de la etapa evolutiva del cuadro clínico (génesis o mantenimiento) además de por las características propias (p.ej., sexo y cepa animal) de los sujetos utilizados en el estudio (*Pertovaara, 2013*). Conviene también tener en cuenta que dependiendo del tipo de receptor adrenérgico y de su localización (central o periférica, presináptica o postsináptica), es posible obtener efectos diferentes, incluso contrarios, sobre un determinado parámetro, incluido el comportamiento nocifensivo, tras la administración de un fármaco con afinidad por el mismo.

Además, la distribución ubicua de los receptores adrenérgicos determine que el uso de agonistas adrenérgicos conlleve de forma casi inevitable la aparición de efectos colaterales. Es por ello que, a pesar de la múltiples evidencias referidas en la literatura sobre la implicación del SNS en el dolor neuropático, la intervención sobre este sistema apenas se haya instaurado en la clínica del dolor, excepción hecha de los bloqueos simpáticos (quirúrgico o farmacológico mediante el uso de anestésicos locales, toxina botulínica etc.) que ocasionalmente se practican en pacientes con SDRC (*Goh et al., 2017*).

Sin embargo, la resistencia al tratamiento de muchos cuadros de dolor crónico hace desaconsejable a nuestro entender descartar ninguna línea de investigación aunque hasta el momento no haya resultado suficientemente fructífera. A este respecto, los resultados de nuestro

trabajo plantean nuevas cuestiones y posibilidades que consideramos conveniente explorar en el futuro inmediato:

- ✓ En relación con las modificaciones que experimenta la médula adrenal en los animales con CCI del nervio ciático:

- Estudiar las posibles modificaciones existentes en la excitabilidad (descarga espontánea e inducida –por la inyección de corriente o la activación de nAChRs– de potenciales de acción; potencial de membrana en reposo) de las células cromafines.
- Caracterizar los contingentes vesiculares implicados en la exocitosis inducida por la entrada de Ca^{2+} a través de canales Ca_v
- Llevar a cabo un análisis amperométrico de la respuesta secretora de CAs por las células cromafines.

- ✓ En relación con la PNMT como diana farmacológica:

- Estudiar el efecto de la inhibición de la PNMT en modelos animales de neuropatías periféricas con elevada prevalencia clínica, como la diabética o la inducida por antineoplásicos.
- Analizar las características fenotípicas en animales KO para la PNMT de la CCI del nervio ciático, la neuropatía diabética o la neuropatía inducida por antineoplásicos.

- ✓ En relación con el receptor α_2 adrenérgico periférico como diana farmacológica:

- Evaluar la posibilidad de obtener un efecto analgésico carente de efecto hipertensivo. Para ello, se propone investigar el efecto de la coadministración de MPV2426 y de antagonistas selectivos de los receptores adrenérgicos del tipo α_2B (ARC239; *Link et al., 1996; Wong et al., 2010*); alternatively, se evaluará el efecto de la asociación de MPV2426 con carvedilol, un antagonista de los receptores α_1 y β adrenérgicos con efecto hipotensor. Esta última combinación presenta el interés añadido de que el carvedilol podría ejercer por sí mismo un efecto antialodínico.
- Analizar el efecto del estrés por frío, de diferentes modelos de neuropatía periférica y del tratamiento con dexmedetomidina y/o MPV2426 de sobre la expresión de la GRK2, la enzima responsable de internalización (*down-regulation*) de los receptores α_2

adrenérgicos, a nivel de la médula adrenal. La actividad de dicha enzima se encuentra aumentada en patologías como la insuficiencia cardiaca, condicionando una menor actividad de los receptores α_2 adrenérgicos (*Lymperopoulos et al., 2007*).

VI. CONCLUSIONES

“No te rías nunca de las lágrimas de un niño. Todos los dolores son iguales”

Charles Van Lerberghe

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo y de la discusión de los mismos, podemos formular las siguientes conclusiones:

- 1^a. La constricción crónica del nervio ciático de la rata constituye un modelo experimental adecuado para la valoración de la alodinia mecánica y térmica como indicadores de dolor neuropático, permitiendo la evaluación de fármacos potencialmente útiles en esa indicación.
- 2^a. Este modelo comporta un aumento de la actividad simpatoadrenomedular que se manifestaría por el aumento de la transmisión en la unión esplacno-cromafín, una mayor expresión de receptores nicotínicos en la membrana y el incremento de la exocitosis de catecolaminas por las células cromafines de la médula adrenal. Así mismo, la lesión del nervio ciático se asocia al aumento de la inervación catecolaminérgica en los ganglios espinales, el incremento de la excitabilidad de los somas de las neuronas nociceptivas primarias y el desarrollo de un tono adrenérgico algésico en la plata del pie de la extremidad afecta.
- 3^a. El SKF29661, un inhibidor de la feniletanolamina-N-metiltransferasa (PNMT), ejerce un efecto antialodínico mecánico y térmico probablemente relacionado con la inhibición de la síntesis y liberación de adrenalina por las células cromafines de la médula adrenal.
- 4^a. La dexmedetomidina ejerce un efecto antialodínico carente de acción sedante. A concentraciones clínicamente relevantes (100 nM) inhibe la transmisión sináptica en la unión esplacno-cromafín, la entrada de Ca^{2+} a través de los canales de Ca_v y la exocitosis de catecolaminas por un mecanismo dependiente de la activación de receptores α_2 adrenérgicos; así mismo, a concentraciones en el rango micromolar, la dexmedetomidina inhibe los nAChRs y las conductancias de Na^+ y K^+ dependientes de voltaje de las células cromafines. Si bien estos efectos no estarían relacionados con la activación de los receptores α_2 adrenérgicos, podrían contribuir al efecto analgésico de la dexmedetomidina tras su administración local.
- 5^a. El MPV2426, un agonista α_2 adrenérgico de acción periférica, induce un efecto antialodínico en el que dependiendo de la vía de administración (local o sistémica) podrían estar involucrados los receptores α_2 adrenérgicos de las células cromafines de la médula adrenal, de las neuronas nociceptivas primarias y de las terminaciones nerviosas de las neuronas simpáticas posganglionares.

- 6^a. En conjunto, nuestros resultados permiten considerar a la PNMT y al receptor α_2 adrenérgico de la médula adrenal como nuevas dianas para el tratamiento de aquellos cuadros de dolor en los que la activación del sistema simpatoadrenal desempeñe un papel fisiopatológico relevante.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Sin herir dolor hacéis, y sin dolor deshacéis el amor de las criaturas”

Santa Teresa de Jesús

1. Abbracchio MP, Saffrey MJ, Höpker V, Burnstock G. Modulation of astroglial cell proliferation by analogues of adenosine and ATP in primary cultures of rat striatum. *Neuroscience*. 1994 Mar;59(1):67-76. PubMed PMID: 8190273. eng.
2. Abbracchio MP, Burnstock G. Purinergic signalling: pathophysiological roles. *Jpn J Pharmacol*. 1998 Oct;78(2):113-45. PubMed PMID: 9829617. eng.
3. Abdulla, F.A., Smith, P.A. Ectopic $\alpha 2$ -adrenoceptors couple to N-type Ca^{2+} channels in axotomized rat sensory neurons. *J.Neurosci*. 1997 17,1633–1641.
4. Adams, D. J. and Nutter, T. J. Calcium permeability and modulation of nicotinic acetylcholine receptor-channels in rat parasympathetic neurons. *J Physiol Paris*. 1992; 86: 67-76.
5. Akaike A, Mine Y, Sasa M, Takaori S. A patch clamp study of muscarinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Oct;255(1):340-5. PubMed PMID: 2213565. eng.
6. Akaike A, Mine Y, Sasa M, Takaori S. Voltage and current clamp studies of muscarinic and nicotinic excitation of the rat adrenal chromaffin cells. *J Pharmacol Exp Ther*. 1990 Oct;255(1):333-9. PubMed PMID: 2213564. eng.
7. Akil H, Owens C, Gutstein H, Taylor L, Curran E, Watson S. Endogenous opioids: overview and current issues. *Drug Alcohol Depend*. 1998 1998 Jun-Jul;51(1-2):127-40. PubMed PMID: 9716935. eng.
8. Albe-Fessard D, Berkley KJ, Kruger L, Ralston HJ, Willis WD. Diencephalic mechanisms of pain sensation. *Brain Res*. 1985 Aug;356(3):217-96. PubMed PMID: 3896408. eng.
9. Albillos, A., Dernick, G., Horstmann, H., Almers, W., Álvarez de Toledo, G. and Lindau, M. The exocytotic event in chromaffin cells revealed by patch amperometry. *Nature*. 1997; 389: 509-12.
10. Albinana, E., Segura-Chama, P., Baraibar, A. M., Hernandez-Cruz, A. and Hernandez-Guijo, J. M. Different contributions of calcium channel subtypes to electrical excitability of chromaffin cells in rat adrenal slices. *J Neurochem*. 2015; 133: 511-21.
11. Albuquerque, E. X., Pereira, E. F., Alkondon, M. and Rogers, S. W. Mammalian nicotinic acetylcholine receptors: from structure to function. *Physiol Rev*. 2009; 89: 73-120.
12. Aley KO, Martin A, McMahon T, Mok J, Levine JD, Messing RO. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci*. 2001 Sep;21(17):6933-9. PubMed PMID: 11517280. eng.
13. Alkondon, M. and Albuquerque, E. X. Diversity of nicotinic acetylcholine receptors in rat hippocampal neurons. I. Pharmacological and functional evidence for distinct structural subtypes. *J Pharmacol Exp Ther*. 1993; 265: 1455-73.
14. Alkondon, M., Pereira, E. F., Cortes, W. S., Maelicke, A. and Albuquerque, E. X. Choline is a selective agonist of $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors in the rat brain neurons. *Eur J Neurosci*. 1997; 9: 2734-42.
15. Amador, M. and Dani, J. A. Mechanism for modulation of nicotinic acetylcholine receptors that can influence synaptic transmission. *J Neurosci*. 1995; 15: 4525-32.
16. Andó, R.D., Méhész, B., Gyires, K., Illes, P. y Sperlágh, B. 2010. A comparative analysis of the activity of ligands acting at P2X and P2Y receptor subtypes in models of neuropathic, acute and inflammatory pain. *Br J Pharmacol*. Vol: 159. 1106-17.
17. Anggono, V., & Huganir, R. L. (2012). Regulation of AMPA receptor trafficking and synaptic plasticity. *Current opinion in neurobiology*, 22(3), 461-469.
18. Antoni, F. A. Hypothalamic control of adrenocorticotropin secretion: advances since the discovery of 41-residue corticotropin-releasing factor. *Endocr Rev*. 1986; 7: 351-78.
19. Apkarian AV, Hodge CJ. A dorsolateral spinothalamic tract in macaque monkey. *Pain*. 1989 Jun;37(3):323-33. PubMed PMID: 2474142. eng.
20. Apkarian AV, Jyväsjärvi E, Knifflki KD, Mengel MK, Stiefenhofer A. Activation of carotid sinus baroreceptors reduces pain sensations evoked by electrical and cold stimulation of human teeth. *Proc Finn Dent Soc*. 1989;85(4-5):409-13. PubMed PMID: 2635784. eng.

21. Arriza JL, Eliasof S, Kavanaugh MP, Amara SG. Excitatory amino acid transporter 5, a retinal glutamate transporter coupled to a chloride conductance. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1997 Apr;94(8):4155-60. PubMed PMID: 9108121. PMCID: PMC20584. eng.
22. Artalejo, A. R., García, A. G. and Neher, E. Small-conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels in bovine chromaffin cells. *Pflugers Arch*. 1993; 423: 97-103.
23. Artalejo, A.R. 1995. Electrical properties of adrenal chromaffin cells, en Herscheler, J. y Scherubel, H. editores: *The electrophysiology of neuroendocrine cells*, CRC Press, Florida. 259-99.
24. Artalejo, A. R. La maquinaria molecular de la exocitosis en las células cromafines de la médula adrenal. *Anal. Real Acad. Farm*. 2005; 71: 127-151.
25. Auerbach, A. and Akk, G. Desensitization of mouse nicotinic acetylcholine receptor channels. A two-gate mechanism. *J Gen Physiol*. 1998; 112: 181-97.
26. Augustine, G. J. and Neher, E. Calcium requirements for secretion in bovine chromaffin cells. *J Physiol*. 1992; 450: 247-71.
27. Aunis, D. and Langley, K. Physiological aspects of exocytosis in chromaffin cells of the adrenal medulla. *Acta Physiol Scand*. 1999; 167: 89-97.
28. Baldelli P, Carabelli V, Novara M, Cesetti T, Andrés-Mateos E, Montiel C, Carbone E. Direct and remote modulation of L-channels in chromaffin cells: distinct actions on $\alpha 1C$ and $\alpha 1D$ subunits? : *Mol Neurobiol*; 2004. p. 73-96.
29. Bandell M, Dubin AE, Petrus MJ, Orth A, Mathur J, Hwang SW, et al. High-throughput random mutagenesis screen reveals TRPM8 residues specifically required for activation by menthol. *Nat Neurosci*. 2006 Apr;9(4):493-500. PubMed PMID: 16520735. Epub 2006/03/05. eng.
30. Bandler, R. and Shipley, M. T. Columnar organization in the midbrain periaqueductal gray: modules for emotional expression? *Trends Neurosci*. 1994. 17, 379–389.
31. Bandler, R., Keay, K. A., Floyd, N., and Price, J. Central circuits mediating patterned autonomic activity during active vs. passive emotional coping. *Brain Res. Bull*. 2000a. 53, 95–104.
32. Bandler, R., Price, J. L., and Keay, K. A. Brain mediation of active and passive emotional coping. *Prog. Brain Res*. 2000b. 122, 333–349.
33. Barbara, J. G. and Takeda, K. Quantal release at a neuronal nicotinic synapse from rat adrenal gland. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996; 93: 9905-9.
34. Barbara, J. G., Poncer, J. C., McKinney, R. A. and Takeda, K. An adrenal slice preparation for the study of chromaffin cells and their cholinergic innervation. *J Neurosci Methods*. 1998; 80: 181-9.
35. Barbara G, De Giorgio R, Stanghellini V, Cremon C, Salvioli B, Corinaldesi R. New pathophysiological mechanisms in irritable bowel syndrome. *Aliment Pharmacol Ther*. 2004 Jul;20 Suppl 2:1-9. PubMed PMID: 15335408. eng.
36. Bardin T. Acute inflammatory arthritis: interleukin-1 blockade: a magic wand for gout? *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Nov;5(11):594-6. PubMed PMID: 19865087. eng.
37. Bardin, L., Malfetes, N., Newman-Tancredi, A. y Depoortere, R. Chronic restraint stress induces mechanical and cold allodynia, and enhances inflammatory pain in rat: Relevance to human stress-associated painful pathologies. *Behav. Brain Res*. 2009. Vol: 205. 360-366.
38. Baruchin, A., Weisberg, E. P., Miner, L. L., Ennis, D., Nisenbaum, L. K., Naylor, E., Stricker, E. M., Zigmond, M. J. and Kaplan, B. B. Effects of cold exposure on rat adrenal tyrosine hydroxylase: an analysis of RNA, protein, enzyme activity, and cofactor levels. *J Neurochem*. 1990; 54: 1769-75.
39. Baruchin, A., Vollmer, R. R., Miner, L. L., Sell, S. L., Stricker, E. M. and Kaplan, B. B. Cold-induced increases in phenylethanolamine N-methyltransferase (PNMT) mRNA are mediated by non-cholinergic mechanisms in the rat adrenal gland. *Neurochem Res*. 1993; 18: 759-66.
40. Basbaum AI, Gautron M, Jazat F, Mayes M, Guilbaud G. The spectrum of fiber loss in a model of neuropathic pain in the rat: an electron microscopic study. *Pain*. 1991 Dec;47(3):359-67.

41. Basbaum AI, Bautista DM, Scherrer G, Julius D. Cellular and molecular mechanisms of pain. *Cell*. 2009 Oct;139(2):267-84. PubMed PMID: 19837031. PMCID: PMC2852643. eng.
42. Beacham, W. S. and Perl, E. R. Background and Reflex Discharge of Sympathetic Preganglionic Neurons in the Spinal Cat. *J Physiol*. 1964; 172: 400-16.
43. Benarroch EE. Dorsal horn circuitry: Complexity and implications for mechanisms of neuropathic pain. *Neurology*. 2016 Mar;86(11):1060-9. PubMed PMID: 26888981. Epub 2016/02/17. eng.
44. Benarroch EE. Involvement of the nucleus accumbens and dopamine system in chronic pain. *Neurology*. 2016 Oct;87(16):1720-6. PubMed PMID: 27655737. Epub 2016/09/21. eng.
45. Bennett, G.J. y Xie, Y.K. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain*. Vol: 33. 87-107.
46. Bennett GJ. Neuropathic pain: new insights, new interventions. *Hosp Pract* (1995). 1998 Oct;33(10):95-8, 101-4, 7-10 passim. PubMed PMID: 9793544. eng.
47. Berumen LC, Rodríguez A, Miledi R, García-Alcocer G. Serotonin receptors in hippocampus. *ScientificWorldJournal*. 2012;2012:823493. PubMed PMID: 22629209. PMCID: PMC3353568. Epub 2012/05/02. eng.
48. Bezanilla, F. and Armstrong, C. M. Inactivation of the sodium channel. I. Sodium current experiments. *J Gen Physiol*. 1977; 70: 549-66.
49. Bhatnagar, S. and Dallman, M. Neuroanatomical basis for facilitation of hypothalamic-pituitary-adrenal responses to a novel stressor after chronic stress. *Neuroscience*. 1998; 84: 1025-39.
50. Bhawe G, Hu HJ, Glauner KS, Zhu W, Wang H, Brasier DJ, et al. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003 Oct;100(21):12480-5. PubMed PMID: 14523239. PMCID: PMC218783. Epub 2003/10/01. eng.
51. Bielefeldt, T. K. and Gebhart, G. F. Visceral Pain: Basic Mechanisms. In: Wall and Melzack's Textbook of Pain, 5th edn (eds. S. B. McMahon and M. Koltzenburg), 2006. pp. 721–736. Elsevier Churchill Livingstone
52. Birder LA, Perl ER. 1999. Expression of $\alpha 2$ -adrenergic receptors in rat primary afferent neurons after peripheral nerve injury or inflammation. *J Physiol* 515:533–542.
53. Birder LA, Kanai AJ, de Groat WC, Kiss S, Nealen ML, Burke NE, et al. Vanilloid receptor expression suggests a sensory role for urinary bladder epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001 Nov;98(23):13396-401. PubMed PMID: 11606761. PMCID: PMC60882. Epub 2001/10/23. eng.
54. Birder LA, Nakamura Y, Kiss S, Nealen ML, Barrick S, Kanai AJ, et al. Altered urinary bladder function in mice lacking the vanilloid receptor TRPV1. *Nat Neurosci*. 2002 Sep;5(9):856-60. PubMed PMID: 12161756. eng.
55. Bixel, M. G., Weise, C., Bolognesi, M. L., Rosini, M., Brierly, M. J., Mellor, I. R., Usherwood, P. N., Melchiorre, C. and Hucho, F. Location of the polyamine binding site in the vestibule of the nicotinic acetylcholine receptor ion channel. *J Biol Chem*. 2001; 276: 6151-60.
56. Blair NT, Bean BP. Roles of tetrodotoxin (TTX)-sensitive Na^+ current, TTX-resistant Na^+ current, and Ca^{2+} current in the action potentials of nociceptive sensory neurons. *J Neurosci*. 2002 Dec 1;22(23):10277-90.
57. Blanchet, C., ErosteGUI, C., Sugawara, M. and Dulon, D. Acetylcholine-induced potassium current of guinea pig outer hair cells: its dependence on a calcium influx through nicotinic-like receptors. *J Neurosci*. 1996; 16: 2574-84.
58. Bliss TV, Collingridge GL. Expression of NMDA receptor-dependent LTP in the hippocampus: bridging the divide. *Mol Brain*. 2013 Jan;6:5. PubMed PMID: 23339575. PMCID: PMC3562207. Epub 2013/01/22. eng.

59. Boada MD, Martin TJ, Peters CM, Hayashida K, Harris MH, Houle TT, et al. Fast-conducting mechanoreceptors contribute to withdrawal behavior in normal and nerve injured rats. *Pain*. 2014 Dec;155(12):2646-55. PubMed PMID: 25267211. PMCID: PMC4374598. Epub 2014/09/28. eng.
60. Bolaños P, Guillen A, Gámez A, Caputo C. Quantifying SOCE fluorescence measurements in mammalian muscle fibres. The effects of ryanodine and osmotic shocks. *J Muscle Res Cell Motil*. 2013 Dec;34(5-6):379-93. PubMed PMID: 24129906. Epub 2013/10/16. eng.
61. Bonica, J. J. Causalgia and Other Reflex Sympathetic Dystrophies. In: *The Management of Pain*, 2nd edn (ed. J. J. Bonica), 1990. pp. 220–243. Lea and Febiger
62. Bonica, J.J. 1990. Definitions and taxonomy of pain. 18-27.
63. Bonica JJMop, Loeser JD, Butler SH, Chapman CR, Turk DC. Bonica's management of pain. 3rd ed. / editor, John D. Loeser / associate editors, Stephen H. Butler, C. Richard Chapman, Dennis C. Turk / illustrator, Marjorie Domenowske. ed. Philadelphia, Pa. ; London: Lippincott Williams & Wilkins; 2001.
64. Boyce-Rustay, J.M. and Jarvis, M.J. Neuropathic Pain: Models and Mechanisms. *Current Pharmaceutical Design*, 2009, 15, 1711-1716 1711
65. Boyce-Rustay JM, Honore P, Jarvis MF. Animal models of acute and chronic inflammatory and nociceptive pain. *Methods Mol Biol*. 2010;617:41-55. PubMed PMID: 20336412. eng.
66. Boyce-Rustay JM, Zhong C, Kohnken R, Baker SJ, Simler GH, Wensink EJ, et al. Comparison of mechanical allodynia and the affective component of inflammatory pain in rats. *Neuropharmacology*. 2010 Feb;58(2):537-43. PubMed PMID: 19703478. Epub 2009/08/22. eng.
67. Boyce-Rustay, J.M., Honore, P. y Jarvis, M.F. 2010. Animal models of acute and chronic inflammatory and nociceptive pain. *Methods Mol.Biol*. Vol: 617. 41-55.
68. Brightwell JJ, Taylor BK. Noradrenergic neurons in the locus coeruleus contribute to neuropathic pain. *Neuroscience*. 2009 Apr;160(1):174-85. PubMed PMID: 19223010. PMCID: PMC2677992. Epub 2009/02/14. eng.
69. Brown DA, Passmore GM. Some new insights into the molecular mechanisms of pain perception. *J Clin Invest*. 2010 May;120(5):1380-3. PubMed PMID: 20424321. PMCID: PMC2860926. Epub 2010/04/26. eng.
70. Bruhl S. An update on the pathophysiology of complex regional pain syndrome. *Anesthesiology*. 2010 Sep;113(3):713-25.
71. Brumovsky PR, La JH, McCarthy CJ, Hökfelt T, Gebhart GF. Dorsal root ganglion neurons innervating pelvic organs in the mouse express tyrosine hydroxylase. *Neuroscience*. 2012 Oct;223:77-91. PubMed PMID: 22858598. PMCID: PMC3491663. Epub 2012/07/31. eng.
72. Buhalog A, Yasuda R, Consigny D, Maurer K, Strother CM. A method for serial selective arterial catheterization and digital subtraction angiography in rodents. *AJNR Am J Neuroradiol*. 2010 Sep;31(8):1508-11. PubMed PMID: 20488903. Epub 2010/05/20. eng.
73. Burgoyne, R. D. Control of exocytosis in adrenal chromaffin cells. *Biochim Biophys Acta*. 1991; 1071: 174-202.
74. Burgoyne, R. D., Morgan, A., Robinson, I., Pender, N. and Cheek, T. R. Exocytosis in adrenal chromaffin cells. *J Anat*. 1993; 183 (Pt 2): 309-14.
75. Callaghan B, Haythornthwaite A, Berecki G, Clark RJ, Craik DJ, Adams DJ. Analgesic alpha-conotoxins Vc1.1 and RglA inhibit N-type calcium channels in rat sensory neurons via GABAB receptor activation. *J Neurosci*. 2008 Oct;28(43):10943-51. PubMed PMID: 18945902. eng.
76. Cannon, W. B. Organization for physiological homeostasis. *Physiol Rev*. 1929; 9: 399-431.
77. Carabelli, V., Giacippoli, A., Baldelli, P., Carbone, E. y Artalejo, A.R. 2003. Distinct potentiation of L-type currents and secretion by cAMP in rat chromaffin cells. *Biophys.J*. Vol: 85. 1326-1337.

78. Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V. and Carbone, E. Fast exocytosis mediated by T- and L-type channels in chromaffin cells: distinct voltage-dependence but similar Ca^{2+} -dependence. *Eur Biophys J.* 2007a; 36: 753-62.
79. Carabelli, V., Marcantoni, A., Comunanza, V., de Luca, A., Diaz, J., Borges, R. and Carbone, E. Chronic hypoxia up-regulates $\alpha 1\text{H}$ T-type channels and low-threshold catecholamine secretion in rat chromaffin cells. *J Physiol.* 2007b; 584: 149-65.
80. Caroline J Sharp, Alison J Reeve, Sue D Collins, Jo C Martindale, Scott G Summerfield, Becky S Sargent, Simon T Bate, Iain P Chessell. Investigation into the role of P2X3/P2X2/3 receptors in neuropathic pain following chronic constriction injury in the rat: an electrophysiological study. *Br J Pharmacol.* 2006 Jul; 148(6): 845–852.
81. Carrasco, G. A. and Van de Kar, L. D. Neuroendocrine pharmacology of stress. *Eur J Pharmacol.* 2003; 463: 235-72.
82. Carrasco-Serrano, C. and Criado, M. Glucocorticoid activation of the neuronal nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit gene: involvement of transcription factor Egr-1. *FEBS Lett.* 2004; 566: 247-50.
83. Casale R, Symeonidou Z, Bartolo M. Topical Treatments for Localized Neuropathic Pain. *Curr Pain Headache Rep.* 2017 Mar;21(3):15. PubMed PMID: 28271334. PMCID: PMC5340828. eng.
84. Caterina MJ, Julius D. The vanilloid receptor: a molecular gateway to the pain pathway. *Annu Rev Neurosci.* 2001;24:487-517. PubMed PMID: 11283319. eng.
85. Caterina MJ, Pang Z. TRP Channels in Skin Biology and Pathophysiology. *Pharmaceuticals (Basel).* 2016 Dec;9(4). PubMed PMID: 27983625. PMCID: PMC5198052. Epub 2016/12/14. eng.
86. Caterina MJ, Rosen TA, Tominaga M, Brake AJ, Julius D. A capsaicin-receptor homologue with a high threshold for noxious heat. *Nature.* 1999 Apr;398(6726):436-41. PubMed PMID: 10201375. eng.
87. Cena, V., Nicolas, G. P., Sánchez-García, P., Kirpekar, S. M. and García, A. G. Pharmacological dissection of receptor-associated and voltage-sensitive ionic channels involved in catecholamine release. *Neuroscience.* 1983; 10: 1455-62.
88. Chakraborty D, Selvam A, Kaur B, Wong JWC, Karthikeyan OP. Application of recombinant *Pediococcus acidilactici* BD16 (fcs (+)/ech (+)) for bioconversion of agrowaste to vanillin. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2017 Apr. PubMed PMID: 28432440. Epub 2017/04/21. eng.
89. Chamorro C, Borrallo M, Romera MA. Sedative and analgesic drugs. *Crit Care Med.* 2013 Aug;41(8):e189. PubMed PMID: 23863259. eng.
90. Champiaux, N., Gotti, C., Cordero-Erausquin, M., David, D. J., Przybylski, C., Lena, C., Clementi, F., Moretti, M., Rossi, F. M., Le Novère, N., McIntosh, J. M., Gardier, A. M. and Changeux, J. P. Subunit composition of functional nicotinic receptors in dopaminergic neurons investigated with knock-out mice. *J Neurosci.* 2003; 23: 7820-9.
91. Chan, S. A., Polo-Parada, L. and Smith, C. Action potential stimulation reveals an increased role for P/Q-calcium channel-dependent exocytosis in mouse adrenal tissue slices. *Arch Biochem Biophys.* 2005; 435: 65-73.
92. Chandrasekharan NV, Dai H, Roos KL, Evanson NK, Tomsik J, Elton TS, et al. COX-3, a cyclooxygenase-1 variant inhibited by acetaminophen and other analgesic/antipyretic drugs: cloning, structure, and expression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2002 Oct;99(21):13926-31. PubMed PMID: 12242329. PMCID: PMC129799. Epub 2002/09/19. eng.
93. Chao MV. Neurotrophins and their receptors: a convergence point for many signalling pathways. *Nat Rev Neurosci.* 2003;4:299–309.
94. Chen Y, Michaelis M, Janig W, Devor M. Adrenoreceptor subtype mediating sympathetic-sensory coupling in injured sensory neurons. *J Neurophysiol.* 1996 Dec;76(6):3721-30.
95. Chen, B.S., Peng, H. y Wu, S.N. 2009. Dexmedetomidine, an $\alpha 2$ -adrenergic agonist, inhibits neuronal delayed-rectifier potassium current and sodium current. *Br.J.Anæsth.* Vol: 103. 244-254.

96. Cheng HJ, Ma KT, Li L, Zhao L, Wang Y, Si JQ. Differential expression of alpha-adrenoceptor subtypes in rat dorsal root ganglion after chronic constriction injury. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci.* 2014 Jun;34(3):322-9.
97. Chien SQ, Li C, Li H, Xie W, Pablo CS, Zhang JM. Sympathetic Fiber Sprouting in Chronically Compressed Dorsal Root Ganglia Without Peripheral Axotomy. *J Neuropathic Pain Symptom Palliation.* 2005;1(1):19-23. PubMed PMID: 17387381. PMCID: PMC1832160. eng.
98. Chow, R. H., von Ruden, L. and Neher, E. Delay in vesicle fusion revealed by electrochemical monitoring of single secretory events in adrenal chromaffin cells. *Nature.* 1992; 356: 60-3.
99. Chuang HH, Prescott ED, Kong H, Shields S, Jordt SE, Basbaum AI, et al. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature.* 2001 Jun;411(6840):957-62. PubMed PMID: 11418861. eng.
100. Chung KS, Lee BH, Yoon YW, Chung JM. Sympathetic sprouting in the dorsal root ganglia of the injured peripheral nerve in a rat neuropathic pain model. *J Comp Neurol* 1996 376:241–252
101. Codignola, A., Tarroni, P., Cattaneo, M. G., Vicentini, L. M., Clementi, F. and Sher, E. Serotonin release and cell proliferation are under the control of alpha-bungarotoxin-sensitive nicotinic receptors in small-cell lung carcinoma cell lines. *FEBS Lett.* 1994; 342: 286-90.
102. Coggan, J. S. and Thompson, S. H. Cholinergic modulation of the Ca²⁺ response to bradykinin in neuroblastoma cells. *Am J Physiol.* 1997; 273: C612-7.
103. Cole, M. A., Kalman, B. A., Pace, T. W., Topczewski, F., Lowrey, M. J. and Spencer, R. L. Selective blockade of the mineralocorticoid receptor impairs hypothalamic-pituitary-adrenal axis expression of habituation. *J Neuroendocrinol.* 2000; 12: 1034-42.
104. Collingridge GL, Manahan-Vaughan D, Nicoletti F, Schoepp DD. Metabotropic glutamate receptors, 5 years on. *Neuropharmacology.* 2017 Mar;115:1-3. PubMed PMID: 27908770. Epub 2016/11/29. eng.
105. Colomer, C., Olivos Ore, L.A., Coutry, N., Mathieu, M.N., Arthaud, S., Fontanaud, P., Iankova, I., Macari, F., Thouennon, E., Yon, L., Anouar, Y. y Guerineau, N.C. 2008. Functional remodeling of gap junction-mediated electrical communication between adrenal chromaffin cells in stressed rats. *J.Neurosci.* Vol: 28. 6616-6626.
106. Colomer, C., Lafont, C. and Guerineau, N. C. Stress-induced intercellular communication remodeling in the rat adrenal medulla. *Ann N Y Acad Sci.* 2008a; 1148: 106-11.
107. Colomer, C., Desarmenien, M. G. and Guerineau, N. C. Revisiting the stimulus-secretion coupling in the adrenal medulla: role of gap junction-mediated intercellular communication. *Mol Neurobiol.* 2009; 40: 87-100.
108. Colomer, C., Olivos-Ore, L. A., Vincent, A., McIntosh, J. M., Artalejo, A. R. and Guerineau, N. C. Functional characterization of alpha9-containing cholinergic nicotinic receptors in the rat adrenal medulla: implication in stress-induced functional plasticity. *J Neurosci.* 2010; 30: 6732-42.
109. Colomer, C., Martin, A. O., Desarmenien, M. G. and Guerineau, N. C. Gap junction-mediated intercellular communication in the adrenal medulla: an additional ingredient of stimulus-secretion coupling regulation. *Biochim Biophys Acta.* 2012; 1818: 1937-51.
110. Colquhoun, L. M. and Patrick, J. W. Pharmacology of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subtypes. *Adv Pharmacol.* 1997; 39: 191-220.
111. Comb M, Seeburg PH, Adelman J, Eiden L, Herbert E. Primary structure of the human Met- and Leu-enkephalin precursor and its mRNA. *Nature.* 1982 Feb;295(5851):663-6. PubMed PMID: 7057924. eng.
112. Coull JA, Beggs S, Boudreau D, Boivin D, Tsuda M, Inoue K, et al. BDNF from microglia causes the shift in neuronal anion gradient underlying neuropathic pain. *Nature.* 2005 Dec;438(7070):1017-21. PubMed PMID: 16355225. eng.
113. Coupland, R. E. Electron microscopic observations on the structure of the rat adrenal medulla: II. Normal innervation. *J Anat.* 1965; 99: 255-72.

114. Coupland, R. E., Pyper, A. S. and Hopwood, D. A Method for Differentiating between Noradrenaline- and Adrenaline-Storing Cells in the Light and Electron Microscope. *Nature*. 1964; 201: 1240-2.
115. Coupland, R. E., Parker, T. L., Kesse, W. K. and Mohamed, A. A. The innervation of the adrenal gland. III. Vagal innervation. *J Anat*. 1989; 163: 173-81.
116. Cui, J.G., Linderoth, B. y Meyerson, B.A. 1996. Effects of spinal cord stimulation on touch-evoked allodynia involve GABAergic mechanisms. An experimental study in the mononeuropathic rat. *Pain*. Vol: 66. 287-295.
117. Cull-Candy, S. G., Mathie, A. and Powis, D. A. Acetylcholine receptor channels and their block by clonidine in cultured bovine chromaffin cells. *J Physiol*. 1988; 402: 255-78.
118. Cullinan, W. E., Herman, J. P. and Watson, S. J. Ventral subicular interaction with the hypothalamic paraventricular nucleus: evidence for a relay in the bed nucleus of the stria terminalis. *J Comp Neurol*. 1993; 332: 1-20.
119. Cullinan, W. E. GABA(A) receptor subunit expression within hypophysiotropic CRH neurons: a dual hybridization histochemical study. *J Comp Neurol*. 2000; 419: 344-51.
120. Cunningham, E. T., Jr. and Sawchenko, P. E. Anatomical specificity of noradrenergic inputs to the paraventricular and supraoptic nuclei of the rat hypothalamus. *J Comp Neurol*. 1988; 274: 60-76.
121. Curtis, L., Buisson, B., Bertrand, S. and Bertrand, D. Potentiation of human $\alpha 4\beta 2$ neuronal nicotinic acetylcholine receptor by estradiol. *Mol Pharmacol*. 2002; 61: 127-35.
122. Cury Y, Picolo G, Gutierrez VP, Ferreira SH. Pain and analgesia: The dual effect of nitric oxide in the nociceptive system. *Nitric Oxide*. 2011 Oct;25(3):243-54. PubMed PMID: 21723953. Epub 2011/06/24. eng.
123. Dajas-Bailador, F. and Wonnacott, S. Nicotinic acetylcholine receptors and the regulation of neuronal signalling. *Trends Pharmacol Sci*. 2004; 25: 317-24.
124. Dalsgaard T, Kroigaard C, Bek T, Simonsen U. Role of calcium-activated potassium channels with small conductance in bradykinin-induced vasodilation of porcine retinal arterioles. *Invest Ophthalmol Vis Sci*. 2009 Aug;50(8):3819-25. PubMed PMID: 19255162. Epub 2009/02/28. eng.
125. Davies A, Hendrich J, Van Minh AT, Wratten J, Douglas L, Dolphin AC. Functional biology of the $\alpha(2)\delta$ subunits of voltage-gated calcium channels. *Trends Pharmacol Sci*. 2007;28:220-228.
126. De Vry, J., Kuhl, E., Franken-Kunkel, P. y Eckel, G. 2004. Pharmacological characterization of the chronic constriction injury model of neuropathic pain. *Eur.J.Pharmacol*. Vol: 491. 137-148.
127. Devesa I, Ferrándiz-Huertas C, Mathivanan S, Wolf C, Luján R, Changeux JP, et al. α CGRP is essential for algesic exocytotic mobilization of TRPV1 channels in peptidergic nociceptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2014 Dec;111(51):18345-50. PubMed PMID: 25489075. PMCID: PMC4280602. Epub 2014/12/08. eng.
128. Devor, M., Jänig, W., and Michaelis, M. Modulation of activity in dorsal root ganglion neurons by sympathetic activation in nerve-injured rats. *J. Neurophysiol*. 1994. 71, 38-47.
129. Di Angelantonio, S., Matteoni, C., Fabbretti, E. y Nistri, A. 2003. Molecular biology and electrophysiology of neuronal nicotinic receptors of rat chromaffin cells. *Eur.J.Neurosci*. Vol: 17. 2313-2322.
130. Di Cesare Mannelli L, Lucarini E, Micheli L, Mosca I, Ambrosino P, Soldovieri MV, et al. Effects of natural and synthetic isothiocyanate-based H₂S-releasers against chemotherapy-induced neuropathic pain: Role of Kv7 potassium channels. *Neuropharmacology*. 2017 Apr. PubMed PMID: 28431970. Epub 2017/04/18. eng.
131. Dib-Hajj SD, Yang Y, Waxman SG. Genetics and molecular pathophysiology of Na(v)1.7-related pain syndromes. *Adv Genet*. 2008;63:85-110
132. Djouhri L, Koutsikou S, Fang X, McMullan S, Lawson SN. Spontaneous pain, both neuropathic and inflammatory, is related to frequency of spontaneous firing in intact C-fiber nociceptors. *J Neurosci*. 2006 Jan;26(4):1281-92. PubMed PMID: 16436616. eng.

133. Donello JE, Guan Y, Tian M, Cheevers CV, Alcantara M, Cabrera S, Raja SN, Gil DW: A peripheral adrenoceptor-mediated sympathetic mechanism can transform stress-induced analgesia into hiperalgesia. *Anesthesiology* 2011; 114:1403–16.
134. Douglas, W.W. y Rubin, R.P. 1961. Mechanism of nicotinic action at the adrenal medulla: calcium as a link in stimulus-secretion coupling. *Nature*. Vol: 192. 1087-1089.
135. Douglas, W. W. and Rubin, R. P. The role of calcium in the secretory response of the adrenal medulla to acetylcholine. *J Physiol*. 1961a; 159: 40-57.
136. Drummond ES, Dawson LF, Finch PM, Bennett GJ, Drummond PD. Increased expression of cutaneous α 1-adrenoceptors after chronic constriction injury in rats. *J Pain*. 2014 Feb;15(2):188-96.
137. Dumont, M., Day, R. and Lemaire, S. Distinct distribution of immunoreactive dynorphin and leucine enkephalin in various populations of isolated adrenal cromaffin cells. *Life Sci*. 1983; 32: 287-94.
138. Duncan RR, Greaves J, Wiegand UK, Matskevich I, Bodammer G, Apps DK, Shipston MJ, Chow RH. Functional and spatial segregation of secretory vesicle pools according to vesicle age. *Nature*. 2003 Mar 13;422(6928):176-80.
139. Ebert TJ, Hall JE, Barney JA, Uhrich TD, Colino MD. The effects of increasing plasma concentrations of dexmedetomidine in humans. *Anesthesiology*. 2000 Aug;93(2):382-94. PubMed PMID: 10910487. eng.
140. Ehrhart-Bornstein, M., Hinson, J.P., Bornstein, S.R., Scherbaum, W.A. y Vinson, G.P. 1998. Intraadrenal interactions in the regulation of adrenocortical steroidogenesis. *Endocr.Rev*. Vol: 19. 101-143.
141. El-Ayoubi R, Menaouar A, Gutkowska J, Mukaddam-Daher S. Imidazoline receptors but not alpha 2-adrenoceptors are regulated in spontaneously hypertensive rat heart by chronic moxonidine treatment. *J Pharmacol Exp Ther*. 2004 Aug;310(2):446-51. PubMed PMID: 15075383. Epub 2004/04/09. eng.
142. Eranko, O. Histochemistry of noradrenaline in the adrenal medulla of rats and mice. *Endocrinology*. 1955; 57: 363-8.
143. Eranko, O. On the histochemistry of the adrenal medulla of the rat, with special reference to acid phosphatase. *Acta Anat (Basel)*. 1952; 3: 3-60.
144. Esplagues JV. NO as a signalling molecule in the nervous system. *Br J Pharmacol*. 2002 Mar;135(5):1079-95. PubMed PMID: 11877313. PMCID: PMC1573233. eng.
145. Fairman WA, Sonders MS, Murdoch GH, Amara SG. Arachidonic acid elicits a substrate-gated proton current associated with the glutamate transporter EAAT4. *Nat Neurosci*. 1998 Jun;1(2):105-13. PubMed PMID: 10195124. eng.
146. Fang X, Djouhri L, McMullan S, Berry C, Waxman SG, Okuse K, et al. Intense isolectin-B4 binding in rat dorsal root ganglion neurons distinguishes C-fiber nociceptors with broad action potentials and high Nav1.9 expression. *J Neurosci*. 2006 Jul;26(27):7281-92. PubMed PMID: 16822986. eng.
147. Fenwick, E.M., Marty, A. y Neher, E. 1982. Sodium and calcium channels in bovine chromaffin cells. *J.Physiol*. Vol: 331. 599-635.
148. Field AP, Storksen-Coulson H. The interaction of pathways to fear in childhood anxiety: a preliminary study. *Behav Res Ther*. 2007 Dec;45(12):3051-9. PubMed PMID: 17935694. Epub 2007/09/11. eng.
149. Fields H. State-dependent opioid control of pain. *Nat Rev Neurosci*. 2004 Jul;5(7):565-75. PubMed PMID: 15208698. eng.
150. Fitzgerald PB, Maller JJ, Hoy KE, Thomson R, Daskalakis ZJ. Exploring the optimal site for the localization of dorsolateral prefrontal cortex in brain stimulation experiments. *Brain Stimul*. 2009 Oct;2(4):234-7. PubMed PMID: 20633422. Epub 2009/04/03. eng.
151. Foreman, R. D. Organization of the spinothalamic tract as a relay for cardiopulmonary sympathetic afferent fiber activity. *Prog. Sensory Physiol*. 1989. 9, 1–51.
152. Forman, S.A., Chou, J., Strichartz, G.R. y Lo, E.H. 2012. Farmacología de la transmisión GABAérgica y glutatérgica, en Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J. y

- Amstrong, W. A. Editores: *Principios de farmacología: bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico*. Lippincott Williams & Wilkins. 164-185.
153. Gandía L, Casado LF, López MG, García AG. Separation of two pathways for calcium entry into chromaffin cells. *Br J Pharmacol*. 1991 May;103(1):1073-8.
 154. Garofalo NA, Teixeira Neto FJ, Pereira CD, Pignaton W, Vicente F, Alvaides RK. Cardiorespiratory and neuroendocrine changes induced by methadone in conscious and in isoflurane anaesthetised dogs. *Vet J*. 2012 Dec;194(3):398-404.
 155. Goh EL, Chidambaram S, Ma D. Complex regional pain syndrome: a recent update. *Burns Trauma*. 2017 Jan 19;5:2. doi: 10.1186/s41038-016-0066-4. eCollection 2017.
 156. Goldstein, M., Fuxe, K., Hokfelt, T. and Joh, T. H. Immunohistochemical studies on phenylethanolamine-N-methyltransferase, dopa-decarboxylase and dopamine- -hydroxylase. *Experientia*. 1971; 27: 951-2.
 157. Goldstein, C. G. Stress, CA and cardiovascular disease. *Oxford Univ. .* 1995; 539.
 158. Goldstein, D. S. and McEwen, B. Allostasis, homeostats, and the nature of stress. *Stress*. 2002; 5: 55-8.
 159. Goldstein, D. S. Catecholamines and stress. *Endocr Regul*. 2003; 37: 69-80.
 160. Goldstein, D. S. and Kopin, I. J. Evolution of concepts of stress. *Stress*. 2007; 10: 109-20.
 161. Gordon DB, Dahl J, Phillips P, Frandsen J, Cowley C, Foster RL, et al. The use of 'as-needed' range orders for opioid analgesics in the management of acute pain: a consensus statement of the American Society for Pain Management Nursing and the American Pain Society. *Home Healthc Nurse*. 2005 Jun;23(6):388-96; quiz 97-8. PubMed PMID: 15956859. eng.
 162. Goto T, Oh SB, Takeda M, Shinoda M, Sato T, Gunjikake KK, et al. Recent advances in basic research on the trigeminal ganglion. *J Physiol Sci*. 2016 Sep;66(5):381-6. PubMed PMID: 27023716. Epub 2016/03/29. eng.
 163. Grace PM, Hutchinson MR, Maier SF, Watkins LR. Pathological pain and the neuroimmune interface. *Nat Rev Immunol*. 2014 Apr;14(4):217-31. PubMed PMID: 24577438. Epub 2014/02/28. eng.
 164. Griffin, R.S. y Clifford, J.W. 2012. Farmacología de la analgesia, en Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J. y Armstrong, W. A. Editores: *Principios de farmacología: bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico*. Lippincott Williams & Wilkins. 264-283.
 165. Güler AD, Lee H, Iida T, Shimizu I, Tominaga M, Caterina M. Heat-evoked activation of the ion channel, TRPV4. *J Neurosci*. 2002 Aug;22(15):6408-14. PubMed PMID: 12151520. eng.
 166. Gunduz O, Oltulu C, Guven R, Buldum D, Ulugol A. Pharmacological and behavioral characterization of the saphenous chronic constriction injury model of neuropathic pain in rats. *Neurol Sci*. 2011 Dec;32(6):1135-42. PubMed PMID: 21909745. Epub 2011/09/10. eng.
 167. Guneli E, Karabay Yavasoglu NU, Apaydin S, Uyar M. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic pain. *Pharmacol Biochem Behav*. 2007 Nov;88(1):9-17. PubMed PMID: 17651791. Epub 2007/06/28. eng.
 168. Guneli E, Kazikdas KC, Kolatan E. Ghrelin may attenuate proinflammatory cytokine-mediated neuropathic pain. *Med Hypotheses*. 2007;69(2):356-60. PubMed PMID: 17336462. Epub 2007/03/02. eng.
 169. Guneli, E., Karabay Yavasoglu, N.U., Apaydin, S., Uyar, M. y Uyar, M. 2007. Analysis of the antinociceptive effect of systemic administration of tramadol and dexmedetomidine combination on rat models of acute and neuropathic pain. *Pharmacol.Biochem.Behav*. Vol: 88. 9-17.
 170. Gunthorpe MJ, Szallasi A. Peripheral TRPV1 receptors as targets for drug development: new molecules and mechanisms. *Curr Pharm Des*. 2008;14(1):32-41. PubMed PMID:

18220816. eng.
171. Gurish MF, Boyce JA. Mast cell growth, differentiation, and death. *Clin Rev Allergy Immunol.* 2002 Apr;22(2):107-18. PubMed PMID: 11975418. eng.
172. Guyton, Arthur Clifton, John E. Hall, and Arthur C. Guyton. *Tratado de fisiología médica.* Elsevier Brasil, 2006.
173. Gwak YS, Hassler SE, Hulsebosch CE. Reactive oxygen species contribute to neuropathic pain and locomotor dysfunction via activation of CamKII in remote segments following spinal cord contusion injury in rats. *Pain.* 2013 Sep;154(9):1699-708. PubMed PMID: 23707296. Epub 2013/05/15. eng.
174. Häbler HJ, Hilbers K, Jänig W, Koltzenburg M, Kümmel H, Lobenberg-Khosravi N, et al. Viscero-sympathetic reflex responses to mechanical stimulation of pelvic viscera in the cat. *J Auton Nerv Syst.* 1992 May;38(2):147-58. PubMed PMID: 1619212. eng.
175. Hama, A.T. y Borsook, D. 2005. Behavioral and pharmacological characterization of a distal peripheral nerve injury in the rat. *Pharmacol.Biochem.Behav.* Vol: 81. 170-181.
176. Hamill, O.P., Marty, A., Neher, E., Sakmann, B. y Sigworth, F.J. 1981. Improved patch-clamp techniques for high-resolution current recording from cells and cell-free membrane patches. *Pflugers Arch.* Vol: 391. 85-100.
177. Hawkey CJ, Skelly MM. Gastrointestinal safety of selective COX-2 inhibitors. *Curr Pharm Des.* 2002;8(12):1077-89. PubMed PMID: 11945152. eng.
178. Hawkey CJ. NSAID toxicity: where are we and how do we go forward? *J Rheumatol.* 2002 Apr;29(4):650-2. PubMed PMID: 11950001. eng.
179. Hayashida K, Peters CM, Gutierrez S, Eisenach JC. Depletion of endogenous noradrenaline does not prevent spinal cord plasticity following peripheral nerve injury. *J Pain.* 2012 Jan;13(1):49-57. PubMed PMID: 22155404. PMCID: PMC3381881. Epub 2011/12/11. eng.
180. Hayashida K, Kimura M, Yoshizumi M, Hobo S, Obata H, Eisenach JC. Ondansetron reverses antihypersensitivity from clonidine in rats after peripheral nerve injury: role of γ -aminobutyric acid in α 2-adrenoceptor and 5-HT₃ serotonin receptor analgesia. *Anesthesiology.* 2012 Aug;117(2):389-98. PubMed PMID: 22722575. PMCID: PMC3496934. eng.
181. Hendrich J, Van Minh AT, Heblich F, Nieto-Rostro M, Watschinger K, Striessnig J, et al. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the α 2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008 Mar;105(9):3628-33. PubMed PMID: 18299583. PMCID: PMC2265195. Epub 2008/02/25. eng.
182. Hervás C, Pérez-Sen R, Miras-Portugal MT. Presence of diverse functional P2X receptors in rat cerebellar synaptic terminals. *Biochem Pharmacol.* 2005 Sep;70(5):770-85. PubMed PMID: 16018975. eng.
183. Hoffman, B.B. y Williams, F.M. 2012. *Farmacología adrenérgica*, en Golan, D. E., Tashjian, A. H., Armstrong, E. J. y Armstrong, W. A. Editores: *Principios de farmacología: bases fisiopatológicas del tratamiento farmacológico.* Lippincott Williams & Wilkins. 132-147.
184. Hofmann F, Feil R, Kleppisch T, Schlossmann J. Function of cGMP-dependent protein kinases as revealed by gene deletion. *Physiol Rev.* 2006 Jan;86(1):1-23. PubMed PMID: 16371594. eng.
185. Hogan QH. Role of decreased sensory neuron membrane calcium currents in the genesis of neuropathic pain. *Croat Med J.* 2007 Feb;48(1):9-21.
186. Holman ME, Coleman HA, Tonta MA, Parkinson HC. Synaptic transmission from splanchnic nerves to the adrenal medulla of guinea-pigs. *J Physiol (Lond).* 1994. 478:115-124.
187. Holtman JR, Dwoskin LP, Dowell C, Wala EP, Zhang Z, Crooks PA, et al. The novel small molecule α 9 α 10 nicotinic acetylcholine receptor antagonist ZZ-204G is analgesic. *Eur J*

- Pharmacol. 2011 Nov;670(2-3):500-8. PubMed PMID: 21944926. PMCID: PMC3215271. Epub 2011/09/17. eng.
188. Honma, Y., Yamakage, M., Ninomiya, T. Effects of adrenergic stimulus on the activities of Ca^{2+} and K^{+} channels of dorsal root ganglion neurons in a neuropathic pain model. *BrainRes.* 1999 832,195–206.
189. Honore P, Chandran P, Hernandez G, Gauvin DM, Mikusa JP, Zhong C, Joshi SK, Ghilardi JR, Sevcik MA, Fryer RM, et al. Repeated dosing of ABT-102, a potent and selective TRPV1 antagonist, enhances TRPV1-mediated analgesic activity in rodents, but attenuates antagonist-induced hyperthermia. *Pain.* 2009;142:27–35.
190. Hu HJ, Carrasquillo Y, Karim F, Jung WE, Nerbonne JM, Schwarz TL, et al. The kv4.2 potassium channel subunit is required for pain plasticity. *Neuron.* 2006 Apr;50(1):89-100. PubMed PMID: 16600858. eng.
191. Huang, L. Y., Yanping Gu, Y. and Chen., Y. Communication between neuronal somata and satellite glial cells in sensory ganglia. *Glia.* 2013 Oct;61(10):1571-81.
192. Hughes J, Smith T, Morgan B, Fothergill L. Purification and properties of enkephalin - the possible endogenous ligand for the morphine receptor. *Life Sci.* 1975 Jun;16(12):1753-8. PubMed PMID: 1152599. eng.
193. Hunter, J.C., Gogas, K.R., Hedley, L.R., Jacobson, L.O., Kassotakis, L., Thompson, J. y Fontana, D.J. 1997. The effect of novel anti-epileptic drugs in rat experimental models of acute and chronic pain. *Eur.J.Pharmacol.* Vol: 324. 153-160.
194. Jaggi AS, Jain V, Singh N. Animal models of neuropathic pain. *Fundam Clin Pharmacol.* 2011 Feb;25(1):1-28. PubMed PMID: 20030738. eng.
195. Jänig, W. Pain in the Sympathetic Nervous System: Pathophysiological Mechanisms. In: *Autonomic Failure*, 4th edn (eds. C. J. Mathias and R. Bannister), 2002. pp. 99–108. Oxford University Press.
196. Jänig, W. The Integrative Action of the Autonomic Nervous System. *Neurobiology of Homeostasis.* Cambridge University Press. 2006.
197. Jänig, W. 2009. Pain and the Sympathetic Nervous System. 371-384.
198. Jänig W, Levine JD, Michaelis M. Interactions of sympathetic and primary afferent neurons following nerve injury and tissue trauma. *Prog Brain Res.* 1996;113:161-84.
199. Jänig W, Häbler HJ. Sympathetic nervous system: contribution to chronic pain. *Prog Brain Res.* 2000;129:451-68. PubMed PMID: 11098710. eng.
200. Jänig, W. and Baron, R. The Role of the Sympathetic Nervous System in Neuropathic Pain: Clinical Observations and Animal Models. In: *Neuropathic Pain: Pathophysiology and Treatment* (eds. P. T. Hansson, H. L. Fields, R. G. Hill, and P. Marchettini), 2001. pp. 125–149. IASP Press.
201. Jänig, W. and Baron, R. Complex regional pain syndrome is a disease of the central nervous system. *Clin. Auton.* 2002. Res. 12, 150–164.
202. Jänig W and Baron R Sympathetic nervous system and pain. In: Schmidt RF and Willis WD (eds.) *Encyclopedia of Pain*, 2007 pp. 2356–2366. Berlin: Springer.
203. Jänig W, Grossmann L, Gorodetskaya N. Mechano- and thermosensitivity of regenerating cutaneous afferent nerve fibers. *Exp Brain Res.* 2009 Jun;196(1):101-14. PubMed PMID: 19139872. Epub 2009/01/13. eng.
204. Jänig W. Visceral pain - still an enigma? *Pain.* 2010 Nov;151(2):239-40. PubMed PMID: 20673612. Epub 2010/07/29. eng.
205. Jarvis MF. The neural-glial purinergic receptor ensemble in chronic pain states. *Trends Neurosci.* 2010 Jan;33(1):48-57. PubMed PMID: 19914722. Epub 2009/11/14. eng.
206. Jarvis, M.F. 2010. The neural-glial purinergic receptor ensemble in chronic pain states. *Trends Neurosci.* Vol: 33. 48-57.
207. Jasmin L, Tien D, Janni G, Ohara PT. Is noradrenaline a significant factor in the analgesic effect of antidepressants? *Pain.* 2003 Nov;106(1-2):3-8. PubMed PMID: 14581104. eng.
208. Ji RR, Samad TA, Jin SX, Schmoll R, Woolf CJ. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat

- hyperalgesia. *Neuron*. 2002;36:57–68.
209. Johnson Jr., E.M., Cantor, E. & Douglas Jr., J.R. Biochemical and functional evaluation of the sympathectomy produced by the administration of guanethidine to newborn rat. *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 1975. 193, 503 ± 512.
 210. Jones T, Moore T, Rose H, Choo J. (512) The impact of virtual reality on chronic pain. *J Pain*. 2016 Apr;17(4S):S102-S3. PubMed PMID: 28162315. Epub 2016/03/24. eng.
 211. Julius, D. y Basbaum, A.I. 2001. Molecular mechanism of nociception. *Nature*. Vol: 413. 203-210.
 212. Julius, D. y McCleskey, E.W. 2006. Cellular and molecular properties of primary afferent neurons, en McMahon, S., B. y Koltzenburg, M. Editores: *Wall and Melzack's textbook of pain*. Elsevier. Edinburgh. 35.
 213. Junqueira, L. C., and J. Carneiro. "Histología Básica. 2015". Sistema endocrino. Capítulo 20. 12ª edición.
 214. Kakidani H, Furutani Y, Takahashi H, Noda M, Morimoto Y, Hirose T, et al. Cloning and sequence analysis of cDNA for porcine beta-neo-endorphin/dynorphin precursor. *Nature*. 1982 Jul;298(5871):245-9. PubMed PMID: 6123953. eng.
 215. Kanai Y, Hediger MA. The glutamate and neutral amino acid transporter family: physiological and pharmacological implications. *Eur J Pharmacol*. 2003 Oct;479(1-3):237-47. PubMed PMID: 14612154. eng.
 216. Kandel, R.E., Schwartz, H.J. y Jessell, M.T. 2001. *Principios de Neurociencia*, Mc Graw Hill.
 217. Kasper JM, Milton AJ, Smith AE, Laezza F, Taglialatela G, Hommel JD, et al. Cognitive deficits associated with a high-fat diet and insulin resistance are potentiated by overexpression of ecto-nucleotide pyrophosphatase phosphodiesterase-1. *Int J Dev Neurosci*. 2017 Mar. PubMed PMID: 28373023. Epub 2017/03/31. eng.
 218. Kavelaars A. Regulated expression of alpha-1 adrenergic receptors in the immune system. *Brain Behav Immun*. 2002 Dec;16(6):799-807. PubMed PMID: 12480508. eng.
 219. Kawata M, Yuri K, Morimoto M. Steroid hormone effects on gene expression, neuronal structure, and differentiation. *Horm Behav*. 1994 Dec;28(4):477-82. PubMed PMID: 7729816. eng.
 220. Kajiwarra R, Sand O, Kidokoro Y, Barish ME, Iijima T. Functional organization of chromaffin cells and cholinergic synaptic transmission in rat adrenal medulla. *Jpn J Physiol*. 1997. 47:449–464.
 221. Keay, K. A. and Bandler, R. Periaqueductal gray. In: *The Rat Nervous System*, 3rd edn (ed. G. Paxinos), pp. 243–257. . 2004. Academic Press.
 222. Kellenberger S, Schild L. Epithelial sodium channel/degenerin family of ion channels: a variety of functions for a shared structure. *Physiol Rev*. 2002 Jul;82(3):735-67. PubMed PMID: 12087134. eng.
 223. Kessler W, Kirchhoff C, Reeh PW, Handwerker HO. Excitation of cutaneous afferent nerve endings in vitro by a combination of inflammatory mediators and conditioning effect of substance P. *Exp Brain Res*. 1992;91(3):467-76. PubMed PMID: 1282891. eng.
 224. Khasar SG, Miao JP, Jänig W, Levine JD. Modulation of bradykinin-induced mechanical hyperalgesia in the rat by activity in abdominal vagal afferents. *Eur J Neurosci*. 1998 Feb;10(2):435-44. PubMed PMID: 9749706. eng.
 225. Khasar SG, Lin YH, Martin A, Dadgar J, McMahon T, Wang D, et al. A novel nociceptor signaling pathway revealed in protein kinase C epsilon mutant mice. *Neuron*. 1999 Sep;24(1):253-60. PubMed PMID: 10677042. eng.
 226. Khasar SG, McCarter G, Levine JD. Epinephrine produces a beta-adrenergic receptor-mediated mechanical hyperalgesia and in vitro sensitization of rat nociceptors. *J Neurophysiol*. 1999 Mar;81(3):1104-12. PubMed PMID: 10085337. eng.
 227. Khasar SG, Green PG, Miao FJ, Levine JD. Vagal modulation of nociception is mediated by adrenomedullary epinephrine in the rat. *Eur J Neurosci*. 2003 Feb;17(4):909-15.

- PubMed PMID: 12603283. eng.
228. Khasar SG, Dina OA, Green PG, Levine JD. Sound stress-induced long-term enhancement of mechanical hyperalgesia in rats is maintained by sympathoadrenal catecholamines. *J Pain*. 2009 Oct;10(10):1073-7. PubMed PMID: 19576859. PMCID: PMC2757466. Epub 2009/07/02. eng.
 229. Kidokoro Y, Anderson MJ, Gruener R. Changes in synaptic potential properties during acetylcholine receptor accumulation and neurospecific interactions in *Xenopus* nerve-muscle cell culture. *Dev Biol*. 1980 Aug;78(2):464-83. PubMed PMID: 7409310. eng.
 230. Kidokoro Y, Ritchie AK. Chromaffin cell action potentials and their possible role in adrenaline secretion from rat adrenal medulla. *J Physiol*. 1980 Oct;307:199-216. PubMed PMID: 7205664. PMCID: PMC1283041. eng.
 231. Kim SH, Chung JM. An experimental model for peripheral neuropathy produced by segmental spinal nerve ligation in the rat. *Pain*. 1992 Sep;50(3):355-63. PubMed PMID: 1333581. eng.
 232. Kim, D.K., Jung, S.J., Kim, J. y Shin, H.S. 2001. Altered nociceptive response in mice deficient in the $\alpha(1B)$ subunit of the voltage-dependent calcium channel. *Mol.Cell.Neurosci*. Vol: 18. 235-245.
 233. King EW, Audette K, Athman GA, Nguyen HO, Sluka KA, Fairbanks CA. Transcutaneous electrical nerve stimulation activates peripherally located α -2A adrenergic receptors. *Pain*. 2005 Jun;115(3):364-73.
 234. Kitto KF, Haley JE, Wilcox GL. Involvement of nitric oxide in spinally mediated hyperalgesia in the mouse. *Neurosci Lett*. 1992 Dec;148(1-2):1-5. PubMed PMID: 1284437. eng.
 235. Klimis, H., Adams, D.J., Callaghan, B., Nevin, S., Alewood, P.F., Vaughan, C.W., Mozar, C.A. y Christie, M.J. 2011. A novel mechanism of inhibition of high-voltage activated calcium channels by α -conotoxins contributes to relief of nerve injury-induced neuropathic pain. *Pain*. Vol: 152. 259-266.
 236. Koga K, Li S, Zhuo M. Metabotropic Glutamate Receptor Dependent Cortical Plasticity in Chronic Pain. *Curr Neuropharmacol*. 2016;14(5):427-34. PubMed PMID: 27296638. PMCID: PMC4983748. eng.
 237. Koltzenburg, M., Häbler, H.-J., and Jänig, W. Functional reinnervation of the vasculature of the adult cat paw pad by axons originally innervating vessels in hairy skin. *Neuroscience* 1995;67, 245–252.
 238. Kumazawa T, Mizumura K, Koda H, Fukusako H. EP receptor subtypes implicated in the PGE2-induced sensitization of polymodal receptors in response to bradykinin and heat. *J Neurophysiol*. 1996 Jun;75(6):2361-8. PubMed PMID: 8793749. eng.
 239. Kvetnansky R, Sun CL, Lake CR, Thoa N, Torda T, Kopin IJ. Effect of handling and forced immobilization on rat plasma levels of epinephrine, norepinephrine, and dopamine-beta-hydroxylase. *Endocrinology*. 1978 Nov;103(5):1868-74.
 240. Kvetnansky, R., Pacak, K., Sabban, E.L., Kopin, I.J. y Goldstein, D.S. 1998. Stressor specificity of peripheral catecholaminergic activation. *Adv.Pharmacol*. Vol: 42. 556-560.
 241. Kvetnansky, R., Sabban, E. L. and Palkovits, M. Catecholaminergic systems in stress: structural and molecular genetic approaches. *Physiol Rev*. 2009; 89: 535-606.
 242. Laedermann CJ, Abriel H, Decosterd I. Post-translational modifications of voltage-gated sodium channels in chronic pain syndromes. *Front Pharmacol*. 2015 Nov 5;6:263.
 243. Lai L, Wang M, Martin OJ, Leone TC, Vega RB, Han X, et al. A role for peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator 1 (PGC-1) in the regulation of cardiac mitochondrial phospholipid biosynthesis. *J Biol Chem*. 2014 Jan;289(4):2250-9. PubMed PMID: 24337569. PMCID: PMC3900969. Epub 2013/12/11. eng.
 244. Landmann R. Beta-adrenergic receptors in human leukocyte subpopulations. *Eur J Clin Invest*. 1992 Oct;22 Suppl 1:30-6. PubMed PMID: 1333965. eng.
 245. Lee TS, Karl R, Moosmang S, Lenhardt P, Klugbauer N, Hofmann F, et al. Calmodulin kinase II is involved in voltage-dependent facilitation of the L-type Cav1.2 calcium channel: Identification of the phosphorylation sites. *J Biol Chem*. 2006 Sep;281(35):25560-

7. PubMed PMID: 16820363. Epub 2006/07/04. eng.
246. Lemaire, S., Dumont, M., Mercier, P., Lemaire, I. and Calvert, R. Biochemical characterization of various populations of isolated bovine adrenal chromaffin cells. *Neurochem Int.* 1983; 5: 193-200.
247. Lemmens KJ, van de Wier B, Vaes N, Ghosh M, van Zandvoort MA, van der Vijgh WJ, et al. The flavonoid 7-mono-O-(β -hydroxyethyl)-rutoside is able to protect endothelial cells by a direct antioxidant effect. *Toxicol In Vitro.* 2014 Jun;28(4):538-43. PubMed PMID: 24412621. Epub 2014/01/08. eng.
248. Lener MS, Kadriu B, Zarate CA. Ketamine and Beyond: Investigations into the Potential of Glutamatergic Agents to Treat Depression. *Drugs.* 2017 Mar;77(4):381-401. PubMed PMID: 28194724. PMCID: PMC5342919. eng.
249. León D, Hervás C, Miras-Portugal MT. P2Y1 and P2X7 receptors induce calcium/calmodulin-dependent protein kinase II phosphorylation in cerebellar granule neurons. *Eur J Neurosci.* 2006 Jun;23(11):2999-3013. PubMed PMID: 16819989. eng.
250. León D, Marín-García P, Sánchez-Nogueiro J, de la O FO, García-Carmona F, Miras-Portugal MT. P2X agonist BzATP interferes with amplex-red-coupled fluorescence assays. *Anal Biochem.* 2007 Aug;367(1):140-2. PubMed PMID: 17562321. Epub 2007/04/02. eng.
251. Li W, Shi X, Wang L, Guo T, Wei T, Cheng K, Rice KC, Kingery WS, Clark JD. Epidermal adrenergic signaling contributes to inflammation and pain sensitization in a rat model of complex regional pain syndrome. *Pain.* 2013 Aug;154(8):1224-36.
252. Lin YW, Tseng TJ, Lin WM, Hsieh ST. Cutaneous nerve terminal degeneration in painful mononeuropathy. *Exp Neurol* 2001 170:290–296
253. Link, R.E., Desai, K., Hein, L., Stevens, M.E., Chruscinski, A., Bernstein, D., Barsh, G.S., Kobilka, B.K., 1996. Cardiovascular regulation in mice lacking $\alpha 2$ -adrenergic receptor subtypes b and c. *Science* 273, 803–805.
254. Lips, K. S., Pfeil, U. and Kummer, W. Coexpression of $\alpha 9$ and $\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptors in rat dorsal root ganglion neurons. *Neuroscience.* 2002; 115: 1-5.
255. Lips, K. S., Bruggmann, D., Pfeil, U., Vollerthun, R., Grando, S. A. and Kummer, W. Nicotinic acetylcholine receptors in rat and human placenta. *Placenta.* 2005; 26: 735-46.
256. Lips, K. S., König, P., Schatzle, K., Pfeil, U., Krasteva, G., Spies, M., Haberberger, R. V., Grando, S. A. and Kummer, W. Coexpression and spatial association of nicotinic acetylcholine receptor subunits $\alpha 7$ and $\alpha 10$ in rat sympathetic neurons. *J Mol Neurosci.* 2006; 30: 15-6.
257. Liu G, Yan G, Zhu B, Lu L. Design of a video capsule endoscopy system with low-power ASIC for monitoring gastrointestinal tract. *Med Biol Eng Comput.* 2016 Nov;54(11):1779-91. PubMed PMID: 27016367. Epub 2016/03/25. eng.
258. Liu X, Chung K, Chung JM. Ectopic discharges and adrenergic sensitivity of sensory neurons after spinal nerve injury. *Brain Res.* 1999 Dec 4;849(1-2):244-7.
259. Liu, X., Eschenfelder, S., Blenk, K. H., Jänig, W., and Häbler, H. Spontaneous activity of axotomized afferent neurons after L5 spinal nerve injury in rats. *Pain* 2000. 84, 309–318.
260. Livett, B. G., Dean, D. M., Whelan, L. G., Udenfriend, S. and Rossier, J. Co-release of enkephalin and catecholamines from cultured adrenal chromaffin cells. *Nature.* 1981; 289: 317-9.
261. Loiola RA, Reis FC, Kawamoto EM, Scavone C, Abdalla DS, Fernandes L, et al. Role of vascular Kinin B1 and B2 receptors in endothelial nitric oxide metabolism. *Peptides.* 2011 Aug;32(8):1700-5. PubMed PMID: 21704095. Epub 2011/06/16. eng.
262. Lopez de Armentia, M., Leeson, A. H., Stebbing, M. J., Urban, L., and McLachlan, E. M. Responses to sympathomimetics in rat sensory neurones after nerve transection. *Neuroreport* 2003. 14, 9–13.
263. López M.G, Villarroja M y Garcia, A.G. 2008. *Farmacología Básica y Clínica*, en Velázquez, Lorenzo P., Moreno A., Lizasoain, I., Leza, J.C., Moro. M.A. y Portolés, A. Editores: 18ª edición. Editorial médica Panamericana S.A. 145.
264. Lu B, Je HS. Neurotrophic regulation of the development and function of the neuromuscular synapses. *J Neurocytol.* 2003 Jun-Sep;32(5-8):931-41. PubMed

- PMID: 15034277. eng.
265. Lymperopoulos A, Rengo G, Funakoshi H, Eckhart AD, Koch WJ. Adrenal GRK2 upregulation mediates sympathetic overdrive in heart failure. *Nat Med.* 2007 Mar;13(3):315-23. PubMed PMID: 17322894. Epub 2007/02/18. eng.
 266. Lymperopoulos A, Rengo G, Koch WJ. Adrenal adrenoceptors in heart failure: fine-tuning cardiac stimulation. *Trends Mol Med.* 2007 Dec;13(12):503-11. PubMed PMID: 17981507. Epub 2007/11/05. eng.
 267. Lymperopoulos A, Rengo G, Zincarelli C, Soltys S, Koch WJ. Modulation of adrenal catecholamine secretion by in vivo gene transfer and manipulation of G protein-coupled receptor kinase-2 activity. *Mol Ther.* 2008 Feb;16(2):302-7. PubMed PMID: 18223549. Epub 2007/11/27. eng.
 268. Maconochie, D. J. and Knight, D. E. A study of the bovine adrenal chromaffin nicotinic receptor using patch clamp and concentration-jump techniques. *J Physiol.* 1992; 454: 129-53.
 269. Magarinos, A. M. and McEwen, B. S. Stress-induced atrophy of apical dendrites of hippocampal CA3c neurons: involvement of glucocorticoid secretion and excitatory amino acid receptors. *Neuroscience.* 1995; 69: 89-98.
 270. Makau CM, Towett PK, Abelson KS, Kanui TI. Modulation of formalin-induced pain-related behaviour by clonidine and yohimbine in the Speke's hinged tortoise (*Kiniskys spekii*). *J Vet Pharmacol Ther.* 2016 Nov. PubMed PMID: 27891620. Epub 2016/11/27. eng.
 271. Makino, S., Smith, M. A. and Gold, P. W. Increased expression of corticotropin-releasing hormone and vasopressin messenger ribonucleic acid (mRNA) in the hypothalamic paraventricular nucleus during repeated stress: association with reduction in glucocorticoid receptor mRNA levels. *Endocrinology.* 1995; 136: 3299-309.
 272. Malmberg AB, Yaksh TL. Spinal nitric oxide synthesis inhibition blocks NMDA-induced thermal hyperalgesia and produces antinociception in the formalin test in rats. *Pain.* 1993 Sep;54(3):291-300. PubMed PMID: 8233543. eng.
 273. Mana, M. J. and Grace, A. A. Chronic cold stress alters the basal and evoked electrophysiological activity of rat locus coeruleus neurons. *Neuroscience.* 1997; 81: 1055-64.
 274. Maneckjee, R. and Minna, J. D. Opioid and nicotine receptors affect growth regulation of human lung cancer cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990; 87: 3294-8.
 275. Maneu, V., Rojo, J., Mulet, J., Valor, L. M., Sala, F., Criado, M., García, A. G. and Gandía, L. A single neuronal nicotinic receptor $\alpha 3\alpha 7\beta 4^*$ is present in the bovine chromaffin cell. *Ann N Y Acad Sci.* 2002; 971: 165-7.
 276. Mansford KR, Opie L. Comparison of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan. *Lancet.* 1968 Mar;1(7544):670-1. PubMed PMID: 4170654. eng.
 277. Mansvelder, H. D. and McGehee, D. S. Long-term potentiation of excitatory inputs to brain reward areas by nicotine. *Neuron.* 2000; 27: 349-57.
 278. Mantyh PW, Clohisy DR, Koltzenburg M, Hunt SP. Molecular mechanisms of cancer pain. *Nat Rev Cancer.* 2002 Mar;2(3):201-9. PubMed PMID: 11990856. eng.
 279. Mantyh PW. Neurobiology of substance P and the NK1 receptor. *J Clin Psychiatry.* 2002;63 Suppl 11:6-10. PubMed PMID: 12562137. eng.
 280. Marcantoni A, Carabelli V, Comunanza V, Hoddah H, Carbone E. Calcium channels in chromaffin cells: focus on L and T types. *Acta Physiol (Oxf).* 2008 Feb;192(2):233-46. PubMed PMID: 18021322. Epub 2007/11/16. eng.
 281. Marcantoni, A., Baldelli, P., Hernández-Guijo, J. M., Comunanza, V., Carabelli, V. and Carbone, E. L-type calcium channels in adrenal chromaffin cells: role in pace-making and secretion. *Cell Calcium.* 2007; 42: 397-408.
 282. Marino S, Idris AI. Emerging therapeutic targets in cancer induced bone disease: A focus on the peripheral type 2 cannabinoid receptor. *Pharmacol Res.* 2017 May;119:391-403. PubMed PMID: 28274851. Epub 2017/03/06. eng.

283. Martin, A. O., Mathieu, M. N., Chevillard, C. and Guerineau, N. C. Gap junctions mediate electrical signaling and ensuing cytosolic Ca^{2+} increases between chromaffin cells in adrenal slices: A role in catecholamine release. *J Neurosci.* 2001; 21: 5397-405.
284. Martin, A. O., Mathieu, M. N. and Guerineau, N. C. Evidence for long-lasting cholinergic control of gap junctional communication between adrenal chromaffin cells. *J Neurosci.* 2003; 23: 3669-78.
285. Martin, A. O., Alonso, G. and Guerineau, N. C. Agrin mediates a rapid switch from electrical coupling to chemical neurotransmission during synaptogenesis. *J Cell Biol.* 2005a; 169: 503-14.
286. Martin, A. O., Alonso, G. and Guerineau, N. C. [An unexpected role for agrin on cell-to-cell coupling during synaptogenesis]. *Med Sci (Paris).* 2005b; 21: 913-5.
287. Marty, A. Ca-dependent K channels with large unitary conductance in chromaffin cell membranes. *Nature.* 1981; 291: 497-500.
288. Marty, A. and Neher, E. Potassium channels in cultured bovine adrenal chromaffin cells. *J Physiol.* 1985; 367: 117-41.
289. Marubio, L. M., del Mar Arroyo-Jiménez, M., Cordero-Erausquin, M., Lena, C., Le Novère, N., de Kerchove d'Exaerde, A., Huchet, M., Damaj, M. I. and Changeux, J. P. Reduced antinociception in mice lacking neuronal nicotinic receptor subunits. *Nature.* 1999; 398: 805-10.
290. Maruta T, Nemoto T, Satoh S, Kanai T, Yanagita T, Wada A, Tsuneyoshi I. Dexmedetomidine and clonidine inhibit the function of $\text{Na(v)}1.7$ independent of $\alpha(2)$ -adrenoceptor in adrenal chromaffin cells. *J Anesth.* 2011 Aug;25(4):549-57. doi: 10.1007/s00540-011-1168-6. Epub 2011 May 24.
291. Maskos, U. Emerging concepts: novel integration of in vivo approaches to localize the function of nicotinic receptors. *J Neurochem.* 2007; 100: 596-602.
292. Maylie J, Bond CT, Herson PS, Lee WS, Adelman JP. Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and calmodulin. *J Physiol.* 2004 Jan;554(Pt 2):255-61. PubMed PMID: 14500775. PMCID: PMC1664776. Epub 2003/09/18. eng.
293. Maylie, J., Bond, C. T., Herson, P. S., Lee, W. S. and Adelman, J. P. Small conductance Ca^{2+} -activated K^{+} channels and calmodulin. *J Physiol.* 2004; 554: 255-61.
294. McCoy DD, Zhou L, Nguyen AK, Watts AG, Donovan CM, McKemy DD. Enhanced insulin clearance in mice lacking TRPM8 channels. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2013 Jul;305(1):E78-88. PubMed PMID: 23651844. PMCID: PMC3725566. Epub 2013/05/07. eng.
295. McEwen, B. S. and Stellar, E. Stress and the individual. Mechanisms leading to disease. *Arch Intern Med.* 1993; 153: 2093-101.
296. McEwen, B. S. and Wingfield, J. C. The concept of allostasis in biology and biomedicine. *Horm Behav.* 2003; 43: 2-15.
297. McEwen, B. S. Physiology and neurobiology of stress and adaptation: central role of the brain. *Physiol Rev.* 2007; 87: 873-904.
298. McIntosh, J. M., Dowell, C., Watkins, M., Garrett, J. E., Yoshikami, D. and Olivera, B. M. Alpha-conotoxin GIC from *Conus geographus*, a novel peptide antagonist of nicotinic acetylcholine receptors. *J Biol Chem.* 2002; 277: 33610-5.
299. McIntosh, J. M., Azam, L., Staheli, S., Dowell, C., Lindstrom, J. M., Kuryatov, A., Garrett, J. E., Marks, M. J. and Whiteaker, P. Analogs of alpha-conotoxin MII are selective for $\alpha 6$ -containing nicotinic acetylcholine receptors. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 944-52.
300. McIntosh, J. M., Absalom, N., Chebib, M., Elgoyhen, A. B. and Vincler, M. $\alpha 9$ nicotinic acetylcholine receptors and the treatment of pain. *Biochem Pharmacol.* 2009; 78: 693-702.
301. McKemy DD. How cold is it? TRPM8 and TRPA1 in the molecular logic of cold sensation. *Mol Pain.* 2005 Apr;1:16. PubMed PMID: 15847696. PMCID: PMC1087877. Epub 2005/04/22. eng.
302. McLachlan, E. M., Jänig, W., Devor, M., and Michaelis, M. Peripheral nerve injury triggers noradrenergic sprouting within dorsal root ganglia. *Nature* 1993. 363, 543–546.

303. McLachlan, E.M., Jänig, W., Devor, M. & Michaelis, M. . Nerve injury triggers noradrenergic sprouting withindorsal root ganglia. *Nature(Lond.)*, 1993. 363,543±545.
304. Medhurst SJ, Walker K, Bowes M, Kidd BL, Glatt M, Muller M, et al. A rat model of bone cancer pain. *Pain*. 2002 Mar;96(1-2):129-40. PubMed PMID: 11932069. eng.
305. Meller ST, Dykstra C, Pechman PS, Maves TJ, Gebhart GF. Ethanol dose-dependently attenuates NMDA-mediated thermal hyperalgesia in the rat. *Neurosci Lett*. 1993 May;154(1-2):137-40. PubMed PMID: 8361628. eng.
306. Meller ST, Dykstra CL, Gebhart GF. Acute mechanical hyperalgesia is produced by coactivation of AMPA and metabotropic glutamate receptors. *Neuroreport*. 1993 Jul;4(7):879-82. PubMed PMID: 7690264. eng.
307. Meller ST, Gebhart GF. Nitric oxide (NO) and nociceptive processing in the spinal cord. *Pain*. 1993 Feb;52(2):127-36. PubMed PMID: 8455960. eng.
308. Melnikova I. Pain market. *Nat Rev Drug Discov*. 2010 Aug;9(8):589-90. PubMed PMID: 20651743. Epub 2010/07/23. eng.
309. Melzack RyC, K.L. Sensory, motivational, and central control determinants of pain. A new conceptual model. 1968.
310. Meyerson BA, Linderorth B. Mode of action of spinal cord stimulation in neuropathic pain. *J Pain Symptom Manage*. 2006 Apr;31(4 Suppl):S6-12. PubMed PMID: 16647596. eng.
311. Michaelis, M., Devor, M. & Jänig, W. Sympathetic modulation of activity in rat dorsal root ganglion neurons changes over time following peripheral nerve injury. *J.Neurophysiol*. 1996 ,76,753±763.
312. Michaelis, M., Liu, X., and Jänig, W. Axotomized and intact muscle afferents but no skin afferents develop ongoing discharges of dorsal root ganglion origin after peripheral nerve lesion. *J. Neurosci*. 2000. 20, 2742–2748
313. Micó, J.A. y Ortega, A. 2006. Modelos animales de dolor. Vol: 2.
314. Mikić D, Roganović Z, Culafić S, Dimitrijević RR, Begović V, Milanović M. Subdural tuberculous abscess of the lumbar spine in a patient with chronic low back pain. *Vojnosanit Pregl*. 2012 Dec;69(12):1109-13. PubMed PMID: 23424968. eng.
315. Millán C, Sánchez-Prieto J. Differential coupling of N- and P/Q-type calcium channels to glutamate exocytosis in the rat cerebral cortex. *Neurosci Lett*. 2002 Sep;330(1):29-32. PubMed PMID: 12213627. eng.
316. Milligan ED, Watkins LR. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat Rev Neurosci*. 2009 Jan;10(1):23-36. PubMed PMID: 19096368. PMCID: PMC2752436. eng.
317. Milligan G, McGrath JC. GPCR theme editorial. *Br J Pharmacol*. 2009 Sep;158(1):1-4. PubMed PMID: 19719776. PMCID: PMC2795254. eng.
318. Miras-Portugal MT, Díaz-Hernández M, Giráldez L, Hervás C, Gómez-Villafuertes R, Sen RP, et al. P2X7 receptors in rat brain: presence in synaptic terminals and granule cells. *Neurochem Res*. 2003 Oct;28(10):1597-605. PubMed PMID: 14570406. eng.
319. Montell C. The history of TRP channels, a commentary and reflection. *Pflugers Arch*. 2011 May;461(5):499-506. PubMed PMID: 21287198. Epub 2011/02/02. eng.
320. Moore EE. Hypertonic saline dextran for post-injury resuscitation: experimental background and clinical experience. *Aust N Z J Surg*. 1991 Oct;61(10):732-6. PubMed PMID: 1718254. eng.
321. Moran MM, McAlexander MA, Bíró T, Szallasi A. Transient receptor potential channels as therapeutic targets. *Nat Rev Drug Discov*. 2011 Aug;10(8):601-20. PubMed PMID: 21804597. Epub 2011/08/01. eng.
322. Moura E, Afonso J, Hein L, Vieira-Coelho MA. Alpha2-adrenoceptor subtypes involved in the regulation of catecholamine release from the adrenal medulla of mice. *Br J Pharmacol*. 2006 Dec;149(8):1049-58. PubMed PMID: 17075569. PMCID: PMC2014633. Epub 2006/10/30. eng.
323. Muraki K, Sasaoka A, Ohya S, Watanabe M, Imaizumi Y. Effects of KRN4884, a novel K⁺ channel opener, on ionic currents in rabbit femoral arterial myocytes. *J Pharmacol Sci*. 2003 Nov;93(3):289-98. PubMed PMID: 14646246. eng.

324. Nagi SS, Rubin TK, Chelvanayagam DK, Macefield VG, Mahns DA. Allodynia mediated by C-tactile afferents in human hairy skin. *J Physiol.* 2011 Aug 15;589(Pt 16):4065-75.
325. Nahman-Averbuch H, Dayan L, Sprecher E, Hochberg U, Brill S, Yarnitsky D, et al. (365) Pain modulation and autonomic function: the effect of clonidine. *J Pain.* 2016 Apr;17(4S):S66. PubMed PMID: 28162606. Epub 2016/03/24. eng.
326. Nance DM, Sanders VM. Autonomic innervation and regulation of the immune system (1987-2007). *Brain Behav Immun.* 2007 Aug;21(6):736-45. PubMed PMID: 17467231. PMCID: PMC1986730. Epub 2007/04/27. eng.
327. Nassar MA, Stirling LC, Forlani G, Baker MD, Matthews EA, Dickenson AH, Wood JN. Nociceptor-specific gene deletion reveals a major role for Nav1.7 (PN1) in acute and inflammatory pain. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2004;101:12706-12711
328. Nassar MA, Levato A, Stirling LC, Wood JN. Neuropathic pain develops normally in mice lacking both Na(v)1.7 and Na(v)1.8. *Mol Pain.* 2005;1:24
329. Nassar-Gentina V, Pollard HB, Rojas E. Electrical activity in chromaffin cells of intact mouse adrenal gland. *Am J Physiol.* 1988 May;254(5 Pt 1):C675-83. PubMed PMID: 3364553. eng.
330. Neher, E. and Marty, A. Discrete changes of cell membrane capacitance observed under conditions of enhanced secretion in bovine adrenal chromaffin cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1982; 79: 6712-6.
331. Nicholas, A. S., DeBias, D. A., Ehrenfeuchter, W., England, K. M., England, R. W., Greene, C. H., et al. A somatic component to myocardial infarction. *Br. Med. J.* 1985. 291, 13-17.
332. Nicoll RA, Malenka RC. Contrasting properties of two forms of long-term potentiation in the hippocampus. *Nature.* 1995 Sep;377(6545):115-8. PubMed PMID: 7675078. eng.
333. Nirogi R, Goura V, Shanmuganathan D, Jayarajan P, Abraham R. Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J Pharmacol Toxicol Methods.* 2012 Jul;66(1):8-13. PubMed PMID: 22575456. Epub 2012/04/30. eng.
334. Nirogi, R., Goura, V., Shanmuganathan, D., Jayarajan, P. y Abraham, R. 2012. Comparison of manual and automated filaments for evaluation of neuropathic pain behavior in rats. *J.Pharmacol.Toxicol.Methods.* Vol: 66. 8-13.
335. Noël J, Zimmermann K, Busserolles J, Deval E, Alloui A, Diochot S, et al. The mechano-activated K⁺ channels TRAAK and TREK-1 control both warm and cold perception. *EMBO J.* 2009 May;28(9):1308-18. PubMed PMID: 19279663. PMCID: PMC2683043. Epub 2009/03/12. eng.
336. Novikova LN, Novikov LN, Kellerth JO. BDNF abolishes the survival effect of NT-3 in axotomized Clarke neurons of adult rats. *J Comp Neurol.* 2000 Dec;428(4):671-80. PubMed PMID: 11077420. eng.
337. Obata K, Katsura H, Mizushima T, Yamanaka H, Kobayashi K, Dai Y, et al. TRPA1 induced in sensory neurons contributes to cold hyperalgesia after inflammation and nerve injury. *J Clin Invest.* 2005 Sep;115(9):2393-401. PubMed PMID: 16110328. PMCID: PMC1187934. Epub 2005/08/18. eng.
338. Oksuz E, Deniz FE, Gunal O, Demir O, Barut S, Markoc F, et al. Which method is the most effective for preventing postoperative infection in spinal surgery? *Eur Spine J.* 2016 Apr;25(4):1006-11. PubMed PMID: 25893337. Epub 2015/04/19. eng.
339. Olivos L, Artalejo AR. Muscarinic excitation-secretion coupling in chromaffin cells. *Acta Physiol (Oxf).* 2008 Feb;192(2):213-20. PubMed PMID: 18021321. Epub 2007/11/16. eng.
340. Pacak, K., Baffi, J.S., Kvetnansky, R., Goldstein, D.S. y Palkovits, M. 1998. Stressor-specific activation of catecholaminergic systems: implications for stress-related hypothalamic-pituitary-adrenocortical responses. *Adv.Pharmacol.* Vol: 42. 561-564.
341. Pacak, K., Palkovits, M., Yadid, G., Kvetnansky, R., Kopin, I. J. and Goldstein, D. S. Heterogeneous neurochemical responses to different stressors: a test of Selye's doctrine of nonspecificity. *Am J Physiol.* 1998; 275: R1247-55.
342. Pacak, K. and Palkovits, M. Stressor specificity of central neuroendocrine responses: implications for stress-related disorders. *Endocr Rev.* 2001; 22: 502-48.

343. Palkovits, M. and Brownstein, M. J. Handbook of chemical neuroanatomy. 1985; 4: 1-71.
344. Park, H.J., Kim, Y.H., Koh, H.J., Park, C.S., Kang, S.H., Choi, J.H. y Moon, D.E. 2012. Analgesic effects of dexmedetomidine in vincristine-evoked painful neuropathic rats. *J.Korean Med.Sci.* Vol: 27. 1411-1417.
345. Parker, T. L., Mohamed, A. A. and Coupland, R. E. The innervation of the adrenal gland. IV. The source of pre- and postganglionic nerve fibres to the guinea-pig adrenal gland. *J Anat.* 1990; 172: 17-24.
346. Parker, T.L., Kesse, W.K., Mohamed, A.A. y Afework, M. 1993. The innervation of the mammalian adrenal gland. *J.Anat.* Vol: 183. 265-276.
347. Parsons, T. D., Coorssen, J. R., Horstmann, H. and Almers, W. Docked granules, the exocytic burst, and the need for ATP hydrolysis in endocrine cells. *Neuron.* 1995; 15: 1085-96.
348. Pearson D, Gove S, Lancaster J. History of medicine. *Health Info Libr J.* 2001 Sep;18(3):135-6. PubMed PMID: 11780740. eng.
349. Peier AM, Reeve AJ, Andersson DA, Moqrich A, Earley TJ, Hergarden AC, et al. A heat-sensitive TRP channel expressed in keratinocytes. *Science.* 2002 Jun;296(5575):2046-9. PubMed PMID: 12016205. Epub 2002/05/16. eng.
350. Pendleton RG, Gessner G, Sawyer J, Hillegass L, Miller DA. Studies on the long term effects of SK&F 29661 upon adrenal catecholamines. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol.* 1982 Apr;319(1):22-8.
351. Perálvarez-Marín A, Doñate-Macian P, Gaudet R. What do we know about the transient receptor potential vanilloid 2 (TRPV2) ion channel? *FEBS J.* 2013 Nov;280(21):5471-87. PubMed PMID: 23615321. PMCID: PMC3783526. Epub 2013/05/28. eng.
352. Pertovaara A. Antinociceptive properties of fadolmidine (MPV-2426), a novel alpha2-adrenoceptor agonist. *CNS Drug Rev.* 2004;10(2):117-26. PubMed PMID: 15179442. eng.
353. Pertovaara A, Haapalinna A, Sirviö J, Virtanen R. Pharmacological properties, central nervous system effects, and potential therapeutic applications of atipamezole, a selective alpha2-adrenoceptor antagonist. *CNS Drug Rev.* 2005;11(3):273-88. PubMed PMID: 16389294. eng.
354. Pertovaara A. The noradrenergic pain regulation system: a potential target for pain therapy. *Eur J Pharmacol.* 2013 Sep;716(1-3):2-7. PubMed PMID: 23500194. Epub 2013/03/13. eng.
355. Petho G, Reeh PW. Sensory and signaling mechanisms of bradykinin, eicosanoids, platelet-activating factor, and nitric oxide in peripheral nociceptors. *Physiol Rev.* 2012 Oct;92(4):1699-775. PubMed PMID: 23073630. eng.
356. Philipp M, Brede M, Hein L. Physiological significance of alpha(2)-adrenergic receptor subtype diversity: one receptor is not enough. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2002 Aug;283(2):R287-95. PubMed PMID: 12121839. eng.
357. Plattner, H., Artalejo, A. R. and Neher, E. Ultrastructural organization of bovine chromaffin cell cortex-analysis by cryofixation and morphometry of aspects pertinent to exocytosis. *J Cell Biol.* 1997; 139: 1709-17.
358. Pradhan AA, Yu XH, Laird JM. Modality of hyperalgesia tested, not type of nerve damage, predicts pharmacological sensitivity in rat models of neuropathic pain. *Eur J Pain.* 2010 May;14(5):503-9. PubMed PMID: 19963418. Epub 2009/12/05. eng.
359. Raja, S. N., Treede, R. D., Davis, K. D., and Campbell, J. N. Systemic alpha-adrenergic blockade with phentolamine: a diagnostic test for sympathetically maintained pain. *Anesthesiology* 1991. 74, 691-698.
360. Ramer MS, Bisby MA. Rapid sprouting of sympathetic axons in dorsal root ganglia of rats with a chronic constriction injury. *Pain* 1997 70:237-244.
361. Randall lo, Selitto jj. A method for measurement of analgesic activity on inflamed tissue. *Arch Int Pharmacodyn Ther.* 1957 Sep;111(4):409-19. PubMed PMID: 13471093. eng.
362. Randich, A. and Gebhart, G. F. Vagal afferent modulation of nociception. *Brain Res. Rev.* 1992. 17, 77-99.

363. Rang, H. P., Dale, M. M., Ritter, J. M., & Flower, R. J. (2008). Antibióticos. Farmacología. 6ta. ed. Barcelona: Editorial Elsevier.
364. Reid G. ThermoTRP channels and cold sensing: what are they really up to? *Pflugers Arch.* 2005 Oct;451(1):250-63. PubMed PMID: 16075243. Epub 2005/06/17. eng.
365. Ritner HL, Machelska H, Stein C. Immune System Pain and Analgesia. In: Basbaum AI, Bushnell M, editors. *Science of Pain*. 2009. pp. 407–427.
366. Saarto T, Wiffen PJ. Antidepressants for neuropathic pain. *Cochrane Database Syst Rev.* 2007 Oct(4):CD005454. PubMed PMID: 17943857. Epub 2007/10/17. eng.
367. Sabban EL, Kvetnanský R. Stress-triggered activation of gene expression in catecholaminergic systems: dynamics of transcriptional events. *Trends Neurosci.* 2001 Feb;24(2):91-8.
368. Salm AK, McCarthy KD. The evidence for astrocytes as a target for central noradrenergic activity: expression of adrenergic receptors. *Brain Res Bull.* 1992 Sep-Oct;29(3-4):265-75. PubMed PMID: 1393601. eng.
369. Satkunathan N, Livett B, Gayler K, Sandall D, Down J, Khalil Z. Alpha-conotoxin Vc1.1 alleviates neuropathic pain and accelerates functional recovery of injured neurones. *Brain Res.* 2005 Oct;1059(2):149-58. PubMed PMID: 16182258. Epub 2005/09/22. eng.
370. Sato j. Adrenergic excitation of cutaneous pain receptors induced by peripheral nerve injury. *Science.* 1991;251:1608–1610.
371. Sawin, P.D., Traynelis, V.C., Rich, G., Smith, B.A., Maves, T.J., Follett, K.A. y Moore, S.A. 1997. Chymopapain-induced reduction of proinflammatory phospholipase A2 activity and amelioration of neuropathic behavioral changes in an in vivo model of acute sciatica. *J.Neurosurg.* Vol: 86. 998-1006.
372. Schmidt SC, Langrehr JM, Rivas E. [Invagination of the ileum as the etiology of acute abdomen in adults]. *Zentralbl Chir.* 2000;125(11):907-9. PubMed PMID: 11143515. ger.
373. Schwab JM, Beiter T, Linder JU, Laufer S, Schulz JE, Meyermann R, et al. COX-3--a virtual pain target in humans? *FASEB J.* 2003 Dec;17(15):2174-5. PubMed PMID: 14656977. eng.
374. Segall SK, Maixner W, Belfer I, Wiltshire T, Seltzer Z, Diatchenko L. Janus molecule I: dichotomous effects of COMT in neuropathic vs nociceptive pain modalities. *CNS Neurol Disord Drug Targets.* 2012 May;11(3):222-35. PubMed PMID: 22483297. PMCID: PMC3698056. eng.
375. Selye, H. The general adaptation syndrome and the diseases of adaptation. *J Clin Endocrinol Metab.* 1946; 6: 117-230.
376. Sen S, Karthikeyan G, Rao BJ. RecA realigns suboptimally paired frames of DNA repeats through a process that requires ATP hydrolysis. *Biochemistry.* 2000 Aug;39(33):10196-206. PubMed PMID: 10956009. eng.
377. Sherman SE, Luo L, Dostrovsky JO. Altered receptive fields and sensory modalities of rat VPL thalamic neurons during spinal strychnine-induced allodynia. *J Neurophysiol.* 1997 Nov;78(5):2296-308. PubMed PMID: 9356383. eng.
378. Sherman SE, Luo L, Dostrovsky JO. Spinal strychnine alters response properties of nociceptive-specific neurons in rat medial thalamus. *J Neurophysiol.* 1997 Aug;78(2):628-37. PubMed PMID: 9307100. eng.
379. Shi t.s., winzer-serhan u., leslie f., hokfelt t. Distribution and regulation of alpha(2)-adrenoceptors in rat dorsal root ganglia. *Pain.* 2000;84:319–330.
380. Shir Y, Ratner A, Raja SN, Campbell JN, Seltzer Z. Neuropathic pain following partial nerve injury in rats is suppressed by dietary soy. *Neurosci Lett.* 1998 Jan;240(2):73-6. PubMed PMID: 9486475. eng.
381. Sindrup SH, Otto M, Finnerup NB, Jensen TS. Antidepressants in the treatment of neuropathic pain. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 2005 Jun;96(6):399-409. PubMed PMID: 15910402. eng.
382. Smith PK, Nilius B. Transient receptor potentials (TRPs) and anaphylaxis. *Curr Allergy Asthma Rep.* 2013 Feb;13(1):93-100. PubMed PMID: 22972391. eng.

383. Smits H, Ulfenius C, Deumens R, Koopmans GC, Honig WM, van Kleef M, et al. Effect of spinal cord stimulation in an animal model of neuropathic pain relates to degree of tactile "allodynia". *Neuroscience*. 2006 Dec;143(2):541-6. PubMed PMID: 16978792. Epub 2006/09/15. eng.
384. Sommer CM, Kauczor HU, Pereira PL. Locoregional Therapies of Cholangiocarcinoma. *Visc Med*. 2016 Dec;32(6):414-20. PubMed PMID: 28229076. PMCID: PMC5290439. Epub 2016/12/05. eng.
385. Sorimachi M, Nishimura S, Yamagami K. Inability of Ca^{2+} influx through nicotinic ACh receptor channels to stimulate catecholamine secretion in bovine adrenal chromaffin cells: studies with fura-2 and SBFI microfluorometry. *Jpn J Physiol*. 1994;44(4):343-56.
386. Southall MD, Li T, Gharibova LS, Pei Y, Nicol GD, Travers JB. Activation of epidermal vanilloid receptor-1 induces release of proinflammatory mediators in human keratinocytes. *J Pharmacol Exp Ther*. 2003 Jan;304(1):217-22. PubMed PMID: 12490594. eng.
387. Steen KH, Reeh PW. Sustained graded pain and hyperalgesia from harmless experimental tissue acidosis in human skin. *Neurosci Lett*. 1993 May;154(1-2):113-6. PubMed PMID: 8361622. eng.
388. Sterling, P. and Eyer, J. Allostasis: a new paradigm to explain arousal pathology. *Handbook of Life Stress, Cognition and Health*. 1988; 629-649.
389. Stone EA, Ariano MA. Are glial cells targets of the central noradrenergic system? A review of the evidence. *Brain Res Brain Res Rev*. 1989 1989 Oct-Dec;14(4):297-309. PubMed PMID: 2560410. eng.
390. Tai TC, Claycomb R, Siddall BJ, Bell RA, Kvetnansky R, Wong DL. Stress-induced changes in epinephrine expression in the adrenal medulla in vivo. *J Neurochem*. 2007 May;101(4):1108-18.
391. Takazawa T, Choudhury P, Tong CK, Conway CM, Scherrer G, Flood PD, et al. Inhibition Mediated by Glycinergic and GABAergic Receptors on Excitatory Neurons in Mouse Superficial Dorsal Horn Is Location-Specific but Modified by Inflammation. *J Neurosci*. 2017 Mar;37(9):2336-48. PubMed PMID: 28130358. PMCID: PMC5354347. Epub 2017/01/27. eng.
392. Tanaka J, Ichikawa R, Watanabe M, Tanaka K, Inoue Y. Extra-junctional localization of glutamate transporter EAAT4 at excitatory Purkinje cell synapses. *Neuroreport*. 1997 Jul;8(11):2461-4. PubMed PMID: 9261809. eng.
393. Todd, R.D., McDavid, S.M., Brindley, R.L., Jewell, M.L. y Currie, K.P. 2012. Gabapentin inhibits catecholamine release from adrenal chromaffin cells. *Anesthesiology*. Vol: 116. 1013-1024.
394. Tominaga M, Caterina MJ. Thermosensation and pain. *J Neurobiol*. 2004 Oct;61(1):3-12. PubMed PMID: 15362149. eng.
395. Traver E, Torres R, de Mora F, Vergara P. Mucosal mast cells mediate motor response induced by chronic oral exposure to ovalbumin in the rat gastrointestinal tract. *Neurogastroenterol Motil*. 2010 Jan;22(1):e34-43. PubMed PMID: 19682267. Epub 2009/08/13. eng.
396. Ulrich-Lai, Y.M., Figueiredo, H.F., Ostrander, M.M., Choi, D.C., Engeland, W.C. y Herman, J.P. 2006. Chronic stress induces adrenal hyperplasia and hypertrophy in a subregion-specific manner. *Am.J.Physiol.Endocrinol.Metab*. Vol: 291. E965-73.
397. Ulfenius C, Linderöth B, Meyerson BA, Wallin J. Spinal NMDA receptor phosphorylation correlates with the presence of neuropathic signs following peripheral nerve injury in the rat. *Neurosci Lett*. 2006 May;399(1-2):85-90. PubMed PMID: 16469445. Epub 2006/02/08. eng.
398. Ulfend, B. J. and Weinreich, D. (eds.). *Advance in Vagal Afferent Neurobiology*. CRC Press. 2005.
399. Vandaal DH, Espinoza C, Jonas P. Excitement about inhibitory presynaptic terminals. *Neuron*. 2015 Mar;85(6):1149-51. PubMed PMID: 25789750. eng.
400. Vandaal DH, Marcantoni A, Carbone E. Cav1.3 Channels as Key Regulators of Neuron-Like Firings and Catecholamine Release in Chromaffin Cells. *Curr Mol Pharmacol*.

- 2015;8(2):149-61. PubMed PMID: 25966692. PMCID: PMC5384372. eng.
401. Vandael DH, Ottaviani MM, Legros C, Lefort C, Guérineau NC, Allio A, et al. Reduced availability of voltage-gated sodium channels by depolarization or blockade by tetrodotoxin boosts burst firing and catecholamine release in mouse chromaffin cells. *J Physiol*. 2015 Feb;593(4):905-27. PubMed PMID: 25620605. PMCID: PMC4398529. Epub 2015/01/26. eng.
402. Vissers, K. y Meert, T. 2005. A behavioral and pharmacological validation of the acetone spray test in gerbils with a chronic constriction injury. *Anesth. Analg*. Vol: 101. 457-64, table of contents.
403. Voets, T., Neher, E. and Moser, T. Mechanisms underlying phasic and sustained secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*. 1999; 23: 607-15.
404. Voets, T. Dissection of three Ca^{2+} -dependent steps leading to secretion in chromaffin cells from mouse adrenal slices. *Neuron*. 2000; 28: 537-45.
405. Vogel, W. H., Lewis, L. E. and Boehme, D. H. Phenylethanolamine-N-methyltransferase activity in various areas of human brain, tissues and fluids. *Brain Res*. 1976; 115: 357-9.
406. Vollmer, R. R., Baruchin, A., Kolibal-Pegher, S. S., Corey, S. P., Stricker, E. M. and Kaplan, B. B. Selective activation of norepinephrine- and epinephrine-secreting chromaffin cells in rat adrenal medulla. *Am J Physiol*. 1992; 263: R716-21.
407. Vollmer, R. R., Meyers-Schoy, S. A., Kolibal-Pegher, S. S. and Edwards, D. J. The role of the adrenal medulla in neural control of blood pressure in rats. *Clin Exp Hypertens*. 1995; 17: 649-67.
408. Vollmer, R. R., Balcita, J. J., Sved, A. F. and Edwards, D. J. Adrenal epinephrine and norepinephrine release to hypoglycemia measured by microdialysis in conscious rats. *Am J Physiol*. 1997; 273: R1758-63.
409. Von Euler, U. S. A specific sympathomimetic ergonein adrenergic nerve fibers (sympathin) and its relations to adrenaline and nor-adrenaline. *Acta Physiol Scand*. 1946; 12: 79-96.
410. Vrezas I, Willenberg HS, Mansmann G, Hiroi N, Fritzen R, Bornstein SR. Ectopic adrenocorticotropin (ACTH) and corticotropin-releasing hormone (CRH) production in the adrenal gland: basic and clinical aspects. *Microsc Res Tech*. 2003 Jun;61(3):308-14. PubMed PMID: 12768546. eng.
411. Vyden JK, Corday E. The effect of cardiogenic shock on the superior mesenteric circulation. *Geriatrics*. 1971 Sep;26(9):85-9. PubMed PMID: 5125695. eng.
412. Wall PD, Devor M, Inbal R, Scadding JW, Schonfeld D, Seltzer Z, et al. Autotomy following peripheral nerve lesions: experimental anaesthesia dolorosa. *Pain*. 1979 Oct;7(2):103-11. PubMed PMID: 574931. eng.
413. Wallace, D. J., Chen, C. and Marley, P. D. Histamine promotes excitability in bovine adrenal chromaffin cells by inhibiting an M-current. *J Physiol*. 2002; 540: 921-39.
414. Wallenstein GV, Vago DR, Walberer AM. Time-dependent involvement of PKA/PKC in contextual memory consolidation. *Behav Brain Res*. 2002 Jul;133(2):159-64. PubMed PMID: 12110449. eng.
415. Wang, F., Gerzanich, V., Wells, G. B., Anand, R., Peng, X., Keyser, K. and Lindstrom, J. Assembly of human neuronal nicotinic receptor $\alpha 5$ subunits with $\alpha 3$, $\beta 2$, and $\beta 4$ subunits. *J Biol Chem*. 1996; 271: 17656-65.
416. Wang, H. Y., Lee, D. H., Davis, C. B. and Shank, R. P. Amyloid peptide A β (1-42) binds selectively and with picomolar affinity to $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptors. *J Neurochem*. 2000; 75: 1155-61.
417. Wang, H., Yu, M., Ochani, M., Amella, C. A., Tanovic, M., Susarla, S., Li, J. H., Wang, H., Yang, H., Ulloa, L., Al-Abed, Y., Czura, C. J. and Tracey, K. J. Nicotinic acetylcholine receptor $\alpha 7$ subunit is an essential regulator of inflammation. *Nature*. 2003; 421: 384-8.
418. Wang, N., Orr-Urtreger, A. and Korczyn, A. D. The role of neuronal nicotinic acetylcholine receptor subunits in autonomic ganglia: lessons from knockout mice. *Prog Neurobiol*. 2002; 68: 341-60.
419. Watanabe H, Vriens J, Prenen J, Droogmans G, Voets T, Nilius B. Anandamide and arachidonic acid use epoxyeicosatrienoic acids to activate TRPV4 channels. *Nature*. 2003

- Jul;424(6947):434-8. PubMed PMID: 12879072. eng.
420. Watanabe, Y., McKittrick, C. R., Blanchard, D. C., Blanchard, R. J., McEwen, B. S. and Sakai, R. R. Effects of chronic social stress on tyrosine hydroxylase mRNA and protein levels. *Brain Res Mol Brain Res.* 1995; 32: 176-80.
 421. Watkins KW, Shifren K, Park DC, Morrell RW. Age, pain, and coping with rheumatoid arthritis. *Pain.* 1999 Sep;82(3):217-28. PubMed PMID: 10488672. eng.
 422. Weinshilboum, R. and Axelrod, J. Serum dopamine-beta-hydroxylase activity. *Circ Res.* 1971; 28: 307-15.
 423. Weiss AL, Ehrhardt KP, Tolba R. Atypical Facial Pain: a Comprehensive, Evidence-Based Review. *Curr Pain Headache Rep.* 2017 Feb;21(2):8. PubMed PMID: 28251523. eng.
 424. Weisstaub, N., Vetter, D. E., Elgoyhen, A. B. and Katz, E. The $\alpha 9\alpha 10$ nicotinic acetylcholine receptor is permeable to and is modulated by divalent cations. *Hear Res.* 2002; 167: 122-35.
 425. Welsby, P., Rowan, M. and Anwyl, R. Nicotinic receptor-mediated enhancement of long-term potentiation involves activation of metabotropic glutamate receptors and ryanodine-sensitive calcium stores in the dentate gyrus. *Eur J Neurosci.* 2006; 24: 3109-18.
 426. Weyer AD, Lehto SG. Development of TRPM8 Antagonists to Treat Chronic Pain and Migraine. *Pharmaceuticals (Basel).* 2017 Mar;10(2). PubMed PMID: 28358322. Epub 2017/03/30. eng.
 427. Willis WD. Role of the forebrain in nociception. *Prog Brain Res.* 1991;87:1-12. PubMed PMID: 1866442. eng.
 428. Willoughby DA, Moore AR, Colville-Nash PR, Gilroy D. Resolution of inflammation. *Int J Immunopharmacol.* 2000 Dec;22(12):1131-5. PubMed PMID: 11137620. eng.
 429. Wirkner K, Sperlagh B, Illes P. P2X3 receptor involvement in pain states. *Mol Neurobiol.* 2007 Oct;36(2):165-83.
 430. Wong DL. Epinephrine biosynthesis: hormonal and neural control during stress. *Cell Mol Neurobiol.* 2006 Jul-Aug;26(4-6):891-900.
 431. Wong ES, Man RY, Vanhoutte PM, Ng KF. Dexmedetomidine induces both relaxations and contractions, via different $\alpha 2$ -adrenoceptor subtypes, in the isolated mesenteric artery and aorta of the rat. *J Pharmacol Exp Ther.* 2010 Dec;335(3):659-64.
 432. Wong HS, Chen N, Leong PK, Ko KM. β -Sitosterol enhances cellular glutathione redox cycling by reactive oxygen species generated from mitochondrial respiration: protection against oxidant injury in H9c2 cells and rat hearts. *Phytother Res.* 2014 Jul;28(7):999-1006. PubMed PMID: 24281915. Epub 2013/11/26. eng.
 433. Wood, J. G. and Barnett, R. J. Histochemical Demonstration of Norepinephrine at a Fine Structural Level. *J Histochem Cytochem.* 1964; 12: 197-209.
 434. Xiang Z, Xiong Y, Yan N, Li X, Mao Y, Ni X, He C, LaMotte RH, Burnstock G, Sun J. Functional up-regulation of P2X 3 receptors in the chronically compressed dorsal root ganglion. *Pain.* 2008 Nov 15;140(1):23-34.
 435. Xu H, Ramsey IS, Kotecha SA, Moran MM, Chong JA, Lawson D, et al. TRPV3 is a calcium-permeable temperature-sensitive cation channel. *Nature.* 2002 Jul;418(6894):181-6. PubMed PMID: 12077604. Epub 2002/06/23. eng.
 436. Yanarates O, Dogrul A, Yildirim V, Sahin A, Sizlan A, Seyrek M, et al. Spinal 5-HT7 receptors play an important role in the antinociceptive and antihyperalgesic effects of tramadol and its metabolite, O-Desmethyiltramadol, via activation of descending serotonergic pathways. *Anesthesiology.* 2010 Mar;112(3):696-710. PubMed PMID: 20179508. eng.
 437. Yen LD, Bennett GJ, Ribeiro-da-Silva A. Sympathetic sprouting and changes in nociceptive sensory innervation in the glabrous skin of the rat hind paw following partial peripheral nerve injury. *J Comp Neurol.* 2006 Apr 20;495(6):679-90.
 438. Yong TL, Ming LC, Chan KG, Lee LH, Goh BH, Khan TM. The Effectiveness and Safety of Topical Capsaicin in Postherpetic Neuralgia: A Systematic Review and Meta-analysis. *Front Pharmacol.* 2017.
 439. Yuan H, Zhang J, Liu H, Li Z. The protective effects of resveratrol on Schwann cells with

- toxicity induced by ethanol in vitro. *Neurochem Int.* 2013 Sep; 63(3):146-53. PubMed PMID: 23770283. Epub 2013/06/13. eng.
440. Zamponi GW, Lewis RJ, Todorovic SM, Arneric SP, Snutch TP. Role of voltage-gated calcium channels in ascending pain pathways. *Brain Res Rev.* 2009; 60:84–89.
441. Zautra, Alex J., et al. Depression history, stress, and pain in rheumatoid arthritis patients. *Journal of behavioral medicine*, 2007, vol. 30, no 3, p. 187-197.
442. Zheng-Hua, G., Bo-Hua, Z., Zhi-Pu, L. y Zhe-Hui, G. 2004. Effect of gabapentin derivatives on mechanical allodynia-like behaviour in a rat model of chronic sciatic constriction injury. *Bioorg.Med.Chem.Lett.* Vol: 14. 2537-2541.
443. Zhuo M. Ionotropic glutamate receptors contribute to pain transmission and chronic pain. *Neuropharmacology.* 2017 Jan;112(Pt A):228-34. PubMed PMID: 27543416. Epub 2016/08/16. eng.
444. Zhuo M. New mechanisms for pain: from neurons to glia; from spinal cord to cortex. *J Neurochem.* 2017 Mar. PubMed PMID: 28332187. Epub 2017/03/22. eng.
445. Zimmermann K, Leffler A, Babes A, Cendan CM, Carr RW, Kobayashi J, Nau C, Wood JN, Reeh PW. Sensory neuron sodium channel Nav1.8 is essential for pain at low temperatures. *Nature.* 2007;447:855–858.